

DEPARTAMENTO DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**INFLUENCIA DE LA RESISTENCIA A IMIPENEM Y DE
DIFERENTES MECANISMOS DE VIRULENCIA EN
ACINETOBACTER BAUMANNII EN LA COLONIZACIÓN
O INFECCIÓN DE VÍAS RESPIRATORIAS Y LA
MORTALIDAD EN PACIENTES CON VENTILACIÓN
MECÁNICA EN CUIDADOS INTENSIVOS.**

TESIS DOCTORAL
de
M^a ROCÍO ÁLVAREZ MARÍN

Directores:

Jerónimo Pachón Díaz

Rafael López Rojas

Enero 2016

D. Jerónimo Pachón Díaz y D. Rafael López Rojas

CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación INFLUENCIA DE LA RESISTENCIA A IMIPENEM Y DE DIFERENTES MECANISMOS DE VIRULENCIA EN *ACINETOBACTER BAUMANNII* EN LA COLONIZACIÓN O INFECCIÓN DE VÍAS RESPIRATORIAS Y LA MORTALIDAD EN PACIENTES CON VENTILACIÓN MECÁNICA EN CUIDADOS INTENSIVOS ha sido realizado bajo nuestra dirección por la Licenciada D^a M^a del Rocío Álvarez Marín, y reúne las condiciones de calidad necesarias para ser leído y defendido como Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sevilla, a 21 de Enero de 2016.

Rafael López Rojas
DIRECTOR

Jerónimo Pachón Díaz
DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han contribuido a que este proyecto avance, y a las que quisiera transmitir mi más profundo y sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer este proyecto finalizado a mis padres, Emilio e Inma, por su ejemplo, su dedicación y su amor. Ellos encarnan los valores del médico y la persona que quiero ser. Igualmente, agradezco a cada uno de mis hermanos su presencia y su cariño, y a mis abuelos esa capacidad de hacer tuyas mis alegrías.

A mis directores de tesis, sin los que este proyecto no habría sido posible. A Jerónimo, por su impulso imprescindible, por compartir su maestría y por ser inasequible a mis desalientos. A Rafa, por su extraordinaria generosidad, y por enseñarme casi todo lo que sé sobre investigación básica. Gracias por remar conmigo.

Agradezco su preciosa colaboración a todas las instituciones y personas que han participado, directa o indirectamente en este proyecto. Al Instituto de Salud Carlos III que encontrara pertinente financiarlo. A los pacientes, por su participación altruista. A todo el equipo profesional del Hospital Virgen del Rocío (intensivistas, personal de enfermería, microbiólogos, técnicos y celadores) que contribuyeron al desarrollo del proyecto. Sin ellos habría sido imposible llevarlo a cabo.

A todas las personas del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas que han colaborado conmigo para llevar adelante este proyecto. A Juan, por estar siempre dispuesto a ayudar y por el tiempo dedicado, especialmente durante el largo periodo de recogida de muestras. A Younes y Marina, por su imprescindible ayuda con el estudio de factores de virulencia. A Mike, por iniciarme en los estudios moleculares. A todos los demás compañeros: Fernando, Gema, M^a Eugenia, Meritxell y todos aquellos de los que tanto he aprendido. Muchas y muy sinceras gracias, nunca me ha faltado colaboración cuando la he necesitado.

A los doctores Álvaro Pascual y Felipe Fernández Cuenca, y a Francisco Javier Caballero junto con los demás compañeros del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla, por abrirme las puertas de su laboratorio para los estudios de clonalidad.

A todos mis compañeros del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Virgen del Rocío. A José Miguel, por su extraordinaria capacidad de transmitir el entusiasmo y demostrar que sí se puede. A mis tutoras durante el periodo MIR, Manu y Marta, por su buena guía. A mis compañeros de interconsultas, Jose Molina, Julia, nuevamente Manu, María Jesús y Elisa, por ayudarme en el reparto de tareas. Muy especialmente a Julia, que me acompaña y anima en todas mis empresas. No conozco mayor suerte. A ellos y a todos los demás: sois un ejemplo para mí.

A mis profesores y maestros de todas las etapas, que siempre alentaron mi curiosidad científica.

A Manu, siempre. Por la compañía constante, la paciencia y el amor. Por recogerme a horas intempestivas del laboratorio. Por el tiempo que se ha dejado robar. Cualquier proyecto que yo emprenda y acabe, es de los dos.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	11
1. IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .	12
1.1 EL GÉNERO <i>ACINETOBACTER</i> . <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .	12
1.2 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>A. BAUMANNII</i> DE MAYOR INTERÉS EN LA CLÍNICA.	12
1.2.1 SUPERVIVENCIA EN EL MEDIO AMBIENTE.	12
1.2.2 DESARROLLO DE RESISTENCIAS A MÚLTIPLES ANTIMICROBIANOS.	13
1.3.1 RESERVORIOS, MECANISMOS DE TRANSMISIÓN Y SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LAS INFECCIONES POR <i>ACINETOBACTER</i> .	13
1.3.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS MÁS FRECUENTES.	15
1.3.2.1 INFECCIONES RESPIRATORIAS.	15
1.3.2.2 <i>BACTERIEMIA</i> .	16
1.4 PRONÓSTICO DE LAS INFECCIONES PRODUCIDAS POR <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .	17
1.4.1 MORTALIDAD Y MORBILIDAD ASOCIADAS A LA NEUMONÍA POR <i>ACINETOBACTER</i> . FACTORES PRONÓSTICOS.	17
1.4.2 MORTALIDAD Y MORBILIDAD ASOCIADAS A LA BACTERIEMIA POR <i>ACINETOBACTER</i> . FACTORES PRONÓSTICOS.	18
2. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR <i>A. BAUMANNII</i> EN LA SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA ACTUAL.	19
2.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA DEL DESARROLLO DE RESISTENCIAS EN <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> Y SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA ACTUAL.	19
2.2. ANTIBIÓTICOS CON ACTIVIDAD FRENTE A <i>A. BAUMANNII</i> MULTIRRESISTENTE (MDR).	20
2.2.1. CARBAPENEMAS.	20
2.2.2. SULBACTAM.	21
2.2.3. COLISTINA.	21
2.2.4. TIGECICLINA.	22
2.2.5. OTROS.	22
2.2.6. TRATAMIENTO COMBINADO.	22
2.3. TERAPIAS EMERGENTES.	23
3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .	23
3.1 IMPORTANCIA DE LA RESISTENCIA A CARBAPENEMAS EN <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .	24
3.2 PRINCIPALES MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENEMAS EN <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .	25

3.2.1 CARBAPENEMASAS.	25
3.2.2 CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD DE MEMBRANA.	27
3.2.3 ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LAS PBP.	27
3.2.4 SISTEMAS DE EXPULSIÓN ACTIVA: BOMBAS DE EFLUJO.	27
4. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .	28
4.1 ADHERENCIA Y FORMACIÓN DE BIOFILM.	28
4.2 MOTILIDAD EN SUPERFICIE Y ADHERENCIA.	31
4.3 ADQUISICIÓN DE HIERRO.	33
4.4 HEMOLISINAS.	34
4.5 OMPA.	34
4.6. OTROS MECANISMOS.	35
4.7. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LOS MECANISMOS DE VIRULENCIA.	36
5. RELACIÓN ENTRE MECANISMOS DE PATOGENICIDAD Y FACTORES DE VIRULENCIA, Y MECANISMOS DE RESISTENCIA.	37
5.1. PRODUCCIÓN DE BIOFILM Y RESISTENCIA A CARBAPENEMAS.	38
5.2. OMPA Y RESISTENCIA A CARBAPENEMAS.	39
<u>II. HIPÓTESIS.</u>	<u>41</u>
<u>III. OBJETIVOS.</u>	<u>43</u>
<u>IV. MATERIAL Y MÉTODOS.</u>	<u>45</u>
4.1.1. DISEÑO.	46
4.1.2. ÁMBITO Y POBLACIÓN DE ESTUDIO.	46
4.1.3. PERIODO DE ESTUDIO.	46
4.1.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.	46
4.1.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.	46
4.1.4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.	46
4.1.5. DEFINICIONES.	47
4.1.5.1. DEFINICIÓN DE CASO.	47
4.1.6. FUENTES DE INFORMACIÓN.	48
4.1.6.1. IDENTIFICACIÓN DE CASOS.	48
4.1.6.2. RECOGIDA DE INFORMACIÓN.	48
4.1.6.3. SEGUIMIENTO DE LOS CASOS.	48
4.1.7. VARIABLES Y PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS.	48
4.1.7.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS BASALES.	48

4.1.7.2. VARIABLES CLÍNICAS.	49
4.2. OBJETIVOS 2 Y 3	50
4.2.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y CULTIVOS CUANTITATIVOS.	50
4.2.1.1. PROCESAMIENTO INICIAL DE LAS MUESTRAS DE ATB.	50
4.2.1.2. CULTIVOS CUANTITATIVOS.	50
4.2.1.3. PROCESAMIENTO DE LOS HEMOCULTIVOS.	51
4.2.1.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS.	51
4.2.1.5. SELECCIÓN DE AISLADOS DE <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> .	51
4.2.2. ESTUDIO DE LA RELACIÓN CLONAL DE LAS CEPAS.	51
4.2.2.1. REP-PCR.	51
4.2.2.2. ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSADO (PFGE).	52
4.2.3. DETERMINACIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA.	54
4.2.3.1. FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> .	54
4.2.3.2. MOTILIDAD EN SUPERFICIE.	55
4.2.3.3. EXPRESIÓN DE OMPA.	56
4.2.3.4. CAPACIDAD DE ADQUISICIÓN DE HIERRO.	59
4.2.3.5. PRODUCCIÓN DE HEMOLISINAS.	59
4.3.1. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.	61
4.3.1.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE AMIKACINA, CEFTAZIDIMA, CIPROFLOXACINO, COLISTINA, IMIPENEM, RIFAMPICINA, SULBACTAM Y TIGECICLINA.	61
4.3.1.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE AMIKACINA, CEFTAZIDIMA, CIPROFLOXACINO, COLISTINA, IMIPENEM, RIFAMPICINA, SULBACTAM Y TIGECICLINA.	62
4.3.1.3. DETERMINACIÓN DE LA CMI DE MEROPENEM Y DETECCIÓN FENOTÍPICA DE METALOBETALACTAMSAS (MBL).	63
4.3.2. DETERMINACIÓN DE MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENEMAS.	63
4.3.2.1. SELECCIÓN DE AISLADOS.	63
4.3.2.2. DETERMINACIÓN DE OXACILINASAS.	63
4.3.2.3. DETERMINACIÓN DE METALOBETALACTAMASAS.	65
4.3.2.4. EXPRESIÓN DE PORINAS.	66
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	68
4.4.1. VARIABLES.	68
4.4.2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO.	68
4.4.3. ANÁLISIS BIVARIANTE.	68

4.4.4. ANÁLISIS MULTIVARIANTE.	69
4.4.5. EXPRESIÓN DE RESULTADOS.	69
4.4.6. PAQUETE ESTADÍSTICO.	69
V. RESULTADOS.	70
5.1.1. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.	71
5.1.1.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS.	72
5.1.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES AL INGRESO EN LA UCI Y COMPLICACIONES DURANTE EL INGRESO.	72
5.1.1.3. DIAGNÓSTICO DE COLONIZACIÓN RESPIRATORIA, NAVM Y BACTERIEMIA POR <i>A. BAUMANNII</i> .	75
5.1.1.4. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO.	76
5.1.1.5. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.	78
5.1.1.5.1. CONCENTRACIÓN BACTERIANA.	78
5.1.1.5.2. OTROS AISLAMIENTOS MICROBIOLÓGICOS.	79
5.1.1.6. EVOLUCIÓN CLÍNICA Y PRONÓSTICO.	80
5.1.1.6.1. MORTALIDAD.	80
5.1.1.6.2. ESTANCIA EN UCI.	81
5.1.1.6.3. ESTANCIA HOSPITALARIA.	81
5.1.2. FACTORES RELACIONADOS CON LA MORTALIDAD Y ESTANCIA EN UCI.	81
5.1.2.1. FACTORES RELACIONADOS CON LA MORTALIDAD. ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE.	81
5.1.2.2. FACTORES RELACIONADOS CON LA ESTANCIA EN UCI. ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE.	86
5.2.1. RELACIÓN CLONAL DE LAS CEPAS.	88
5.2.1.1. ELECCIÓN DE LAS CEPAS.	88
5.2.1.2. RELACIÓN CLONAL SEGÚN REP-PCR.	88
5.2.1.3. RELACIÓN CLONAL SEGÚN PFGE.	89
5.2.2. FACTORES DE VIRULENCIA.	91
5.2.2.1. FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> . DISTRIBUCIÓN SEGÚN LA CLONALIDAD Y ORIGEN DE LAS CEPAS.	91
5.2.2.2. MOTILIDAD EN SUPERFICIE. DISTRIBUCIÓN SEGÚN LA CLONALIDAD Y ORIGEN DE LAS CEPAS.	93
5.2.2.3. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE HEMOLISINAS.	94
5.2.2.4. CAPACIDAD DE ADQUISICIÓN DE HIERRO.	94

5.2.2.5. EXPRESIÓN DE OMPA.	94
5.2.2.5.1. ELECCIÓN DE CEPAS.	94
5.2.2.5.2. EXPRESIÓN DE OMPA SEGÚN LA CLONALIDAD.	94
5.2.2.5.3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OMPA CON OTROS FACTORES DE VIRULENCIA.	95
5.3.1. RELACIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA CON EL DESARROLLO DE NAVM.	96
5.3.1.1. RELACIÓN DE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> CON EL DESARROLLO DE NAVM.	96
5.3.1.2. RELACIÓN DE LA MOTILIDAD EN SUPERFICIE CON EL DESARROLLO DE NAVM.	96
5.3.1.3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OMPA CON EL DESARROLLO DE NAVM Y NAVM BACTERIÉMICA. ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE.	97
5.3.2. RELACIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA CON LA MORTALIDAD.	98
5.3.2.1. RELACIÓN DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM CON LA MORTALIDAD.	98
5.3.2.2. RELACIÓN DE LA MOTILIDAD EN SUPERFICIE CON LA MORTALIDAD.	100
5.3.2.3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OMPA CON LA MORTALIDAD.	101
5.4.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENEMAS.	103
5.4.1.1. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.	103
5.4.1.2. CARACTERIZACIÓN DE CARBAPENEMASAS.	104
5.4.1.2.1. PRESENCIA DE CARBAPENEMASAS Y RELACIÓN CON LA CMI DE IMPENEM.	
DISTRIBUCIÓN CLONAL.	104
5.4.1.3. ESTUDIO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA Y EXPRESIÓN DE PORINAS.	106
5.4.1.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PORINAS Y RELACIÓN CON LA CMI DE IMPENEM. DISTRIBUCIÓN CLONAL.	106
5.4.1.4. RELACIÓN ENTRE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA Y LOS FACTORES DE VIRULENCIA. DISTRIBUCIÓN CLONAL.	107
VI. DISCUSIÓN.	109
6.1.1. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.	110
6.1.1.1. VARIABLES DEMOGRÁFICAS.	110
6.1.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS BASALES AL INGRESO EN LA UCI Y COMPLICACIONES DURANTE EL INGRESO.	111
6.1.1.3. TRATAMIENTO ANTIMICROBIANO.	113
6.1.1.4. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS.	114
6.1.1.4.1. CONCENTRACIÓN BACTERIANA.	114
6.1.1.5.2. OTROS AISLAMIENTOS MICROBIOLÓGICOS.	116
6.1.1.6. EVOLUCIÓN CLÍNICA Y PRONÓSTICO.	117
6.1.1.6.1. MORTALIDAD.	117

6.1.1.6.2. ESTANCIA EN UCI Y ESTANCIA HOSPITALARIA.	119
6.1.2. FACTORES RELACIONADOS CON LA MORTALIDAD Y ESTANCIA EN UCI.	119
6.1.2.1. FACTORES RELACIONADOS CON LA MORTALIDAD. ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE.	119
6.1.2.2. FACTORES RELACIONADOS CON LA ESTANCIA EN UCI. ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE.	121
6.2.1. RELACIÓN CLONAL DE LAS CEPAS.	122
6.2.2. FACTORES DE VIRULENCIA.	124
6.2.2.1. FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> . DISTRIBUCIÓN SEGÚN LA CLONALIDAD Y ORIGEN DE LAS CEPAS.	124
6.2.2.2. MOTILIDAD EN SUPERFICIE. DISTRIBUCIÓN SEGÚN LA CLONALIDAD Y ORIGEN DE LAS CEPAS.	125
6.2.2.3. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE HEMOLISINAS.	125
6.2.2.4. CAPACIDAD DE ADQUISICIÓN DE HIERRO.	126
6.2.2.5. EXPRESIÓN DE OMPA.	126
6.2.2.5.1. EXPRESIÓN DE OMPA SEGÚN LA CLONALIDAD.	126
6.2.2.5.3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OMPA CON OTROS FACTORES DE VIRULENCIA.	126
6.3.1. RELACIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA CON EL DESARROLLO DE NAVM.	127
6.3.1.1. RELACIÓN DE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> CON EL DESARROLLO DE NAVM.	127
6.3.1.2. RELACIÓN DE LA MOTILIDAD EN SUPERFICIE CON EL DESARROLLO DE NAVM.	129
6.3.1.3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OMPA CON EL DESARROLLO DE NAVM Y NAVM BACTERIÉMICA. ANÁLISIS BIVARIANTE Y MULTIVARIANTE.	129
6.3.2. RELACIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA CON LA MORTALIDAD.	131
6.3.2.1. RELACIÓN DE LA FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i> CON LA MORTALIDAD.	131
6.3.2.2. RELACIÓN DE LA MOTILIDAD EN SUPERFICIE CON LA MORTALIDAD.	132
6.3.2.3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE OMPA CON LA MORTALIDAD.	132
6.4.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A CARBAPENEMAS.	134
6.4.1.1. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS.	134
6.4.1.2. CARACTERIZACIÓN DE CARBAPENEMASAS.	135
6.4.1.2.1. PRESENCIA DE CARBAPENEMASAS Y RELACIÓN CON LA CMI DE IMPENEM. DISTRIBUCIÓN CLONAL.	135
6.4.1.3. ESTUDIO DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA Y EXPRESIÓN DE PORINAS.	138
6.4.1.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PORINAS Y RELACIÓN CON CMI DE IMPENEM. DISTRIBUCIÓN CLONAL.	138

6.4.1.4. RELACIÓN ENTRE LOS MECANISMOS DE RESISTENCIA Y LOS FACTORES DE VIRULENCIA. DISTRIBUCIÓN CLONAL.	140
<u>VII. CONCLUSIONES.</u>	<u>142</u>
<u>VIII. REFERENCIAS.</u>	<u>146</u>

I. INTRODUCCIÓN

1. Importancia clínica de *Acinetobacter baumannii*.

1.1 El género *Acinetobacter*. *Acinetobacter baumannii*.

El género *Acinetobacter* comprende un grupo heterogéneo de cocobacilos gramnegativos no fermentadores, aerobios estrictos, catalasa positivos, oxidasa negativos, no formadores de esporas y no móviles. Entre las principales características de estas especies, se encuentran sus mínimos requerimientos nutricionales y su capacidad de sobrevivir a diferentes temperaturas y ante distintos valores de pH (1).

Mediante técnicas de hibridación de ADN, con fecha de septiembre de 2015 se han identificado 41 genoespecies clasificadas dentro de este género (2). Sólo en 2014 se identificaron cinco nuevas genoespecies, y en 2015 se han añadido las especies *A. bohemicus* y *A. pakistanensis* (2). El presente trabajo se centra en *Acinetobacter baumannii*, correspondiente a la genoespecie 2, que es la de mayor importancia en la práctica clínica por encontrarse frecuentemente implicada en brotes o en endemias de infección nosocomial. Otras genoespecies están siendo aisladas de forma cada vez más frecuente en distintos casos de infecciones comunitarias o nosocomiales, como *A. Iwoffi* (3)(4), *A. haemolyticus* (5)(6) o la *A. pittii* (7), sin embargo, su baja incidencia no les hace adquirir la importancia clínica de *A. baumannii* (8).

1.2 Características microbiológicas de *A. baumannii* de mayor interés en la clínica.

Las dos características microbiológicas del género *Acinetobacter* con implicaciones epidemiológicas clave son la facilidad para sobrevivir durante periodos prolongados en condiciones ambientales adversas y la capacidad de desarrollar patrones de multirresistencia (MDR) frente a distintos antimicrobianos (9).

1.2.1 Supervivencia en el medio ambiente.

Una característica común del género *Acinetobacter* es que se puede encontrar tanto en seres vivos como en cualquier tipo de objeto inanimado húmedo o seco (10), donde puede sobrevivir en superficies durante días (11)(12). Esta gran resistencia a las condiciones ambientales se debe a su habilidad para utilizar en su metabolismo diferentes fuentes de carbono(13).

A. baumannii sobrevive mejor a la desecación que otras especies de *Acinetobacter* (11)(12), pudiendo encontrar cepas viables en superficies secas durante

más de 25 días, mientras que otras especies, como *A. lwoffii*, sobreviven unos 7 días (14) y otros bacilos gramnegativos, como *Pseudomonas aeruginosa* o *Escherichia coli* sobreviven en torno a 24 horas (15). Se ha detectado, además, que la capacidad de persistir a la desecación depende de la fuente del aislado, ya que las cepas clínicas son más resistentes que cepas estándares de la *American Type Culture Collection* (ATCC) debido al número de subcultivos que han sufrido estas últimas con el paso del tiempo (11), y que cepas procedentes de fuentes secas sobreviven mejor que las procedentes de fuentes húmedas (16).

Esta característica tiene gran importancia epidemiológica, ya que permite la presencia de reservorios ambientales duraderos en todo tipo de materiales médicos que, a su vez, se convierten en fuente de brotes nosocomiales y de la persistencia de situaciones endémicas.

1.2.2 Desarrollo de resistencias a múltiples antimicrobianos.

Acinetobacter tiene una elevada capacidad para desarrollar resistencia a todo tipo de antimicrobianos. Es probable que esta capacidad se deba a la ubicuidad de hábitats de *Acinetobacter*, habiendo estado expuesto a la largo de su evolución a todo tipo de organismos productores de antibióticos que existen en diferentes entornos naturales, especialmente en los suelos (9). En un ámbito nosocomial, donde el uso de antibióticos de amplio espectro está siempre en aumento, esta capacidad de rápida adaptación a un medio con elevada presión antimicrobiana ha favorecido la difusión de cepas de *A. baumannii* resistentes a la mayoría de los antimicrobianos conocidos, incluso a todos.

1.3 Situación epidemiológica y manifestaciones clínicas más frecuentes de *Acinetobacter baumannii*.

1.3.1 Reservorios, mecanismos de transmisión y situación epidemiológica de las infecciones por *Acinetobacter*.

La ubicuidad y la resistencia a diferentes condiciones ambientales de *A. baumannii* se encuentran muy relacionadas con su epidemiología y facilitan, dentro del contexto nosocomial, que pueda encontrarse en todo tipo de material médico y quirúrgico, mobiliario, superficies e incluso aire cercano a pacientes portadores (17)(18)(19)(20)(21). El ser humano también actúa como reservorio de *Acinetobacter* spp., que se ha cultivado tanto a partir de la piel como de múltiples secreciones (respiratorias, vaginales, orina o heces, entre otras) (10). Aunque hasta el 44% de los

voluntarios sanos de la comunidad pueden tener colonización cutánea por distintas especies de *Acinetobacter* spp. (22), es excepcional que *A. baumannii* esté presente en ellos. Esta especie adquiere protagonismo en pacientes hospitalizados, en los que produce con facilidad brotes epidémicos y puede alcanzar tasas de colonización elevadas. La cavidad orofaríngea y el tracto respiratorio de pacientes con ventilación mecánica son las localizaciones donde se aísla con mayor frecuencia (20)(23), seguidos por el tracto gastrointestinal, que se considera un reservorio persistente de cepas multirresistentes (24)(25).

El principal mecanismo de transmisión de *Acinetobacter* spp. dentro del hospital son las manos del personal sanitario, a las que llega tras entrar en contacto con un paciente portador o con superficies o fómites contaminados (9)(23). Asimismo, se han comunicado brotes a partir de contacto directo con fómites o instrumentos médicos, como material de soporte respiratorio indebidamente descontaminado (26)(27).

En la actualidad, en la situación epidemiológica de las infecciones por *A. baumannii* destaca la continua aparición de brotes nosocomiales en todo el mundo, así como la presencia de patrones de endemia en algunos centros hospitalarios, lo que dificulta su control y erradicación y favorece la aparición de aislados extremadamente resistentes (28)(21)(29)(30). Las características de los brotes varían dependiendo de las condiciones del hospital (si hay una o múltiples fuentes), y de las particularidades de la cepa, ya que se ha comprobado que algunas presentan mayor tendencia a la propagación en forma de endemia que otras (31). Cepas muy similares no relacionadas epidemiológicamente han sido aisladas de lugares distintos en tiempos diferentes. Estos clones son por lo general multirresistentes, estables genéticamente y con alta capacidad para sobrevivir en medios hospitalarios; su propagación podría estar relacionada, en bajos niveles, con el intercambio de pacientes entre hospitales o por su presencia en la comunidad, y ocasionalmente difundirse entre los centros hospitalarios debido a la presión antibiótica selectiva (31). Los clones denominados I y II son los principales responsables de brotes en los hospitales del noroeste de Europa. Ambos han sido aislados en hospitales españoles. El clon III ha sido aislado en múltiples países europeos, incluido España (32)(33).

1.3.2 Manifestaciones clínicas más frecuentes.

La capacidad de *Acinetobacter* de colonizar cualquier superficie epitelial humana provoca que pueda aislarse en muestras biológicas diversas, como secreciones respiratorias, superficie de heridas u orina, sin que ello implique que exista una infección activa. Aproximadamente la mitad de los aislamientos en muestras clínicas de *A. baumannii* se consideran colonizaciones.

A. baumannii puede causar infecciones en cualquier sistema, aparato u órgano, en particular cuando éste se ve sometido a maniobras invasivas que provocan disrupción de las barreras de defensa naturales. Aunque se han descrito infecciones comunitarias por este microorganismo (34)(35), la mayoría de las infecciones que produce son en el ámbito nosocomial, especialmente en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs). Las más frecuentes son, por este orden: infecciones del tracto respiratorio, bacteriemia, infección del tracto urinario, infección de la herida quirúrgica y meningitis posquirúrgica (36)(37). El presente proyecto se ha focalizado en el tipo de infección respiratoria más frecuentemente causada por *A. baumannii*, la neumonía asociada a ventilación mecánica, así como la bacteriemia asociada a esta entidad.

1.3.2.1 Infecciones respiratorias.

Las infecciones de tracto respiratorio, y en concreto la neumonía y la traqueobronquitis, son las infecciones nosocomiales más frecuentemente causadas por *A. baumannii* (1)(36)(38). Aunque existe una importante variabilidad según la epidemiología local, *A. baumannii* constituyó el 3-5% de todas las neumonías nosocomiales en diferentes series (39)(40). Los pacientes con ventilación mecánica ingresados en UCI son el grupo de mayor riesgo para el desarrollo de neumonías por *A. baumannii* (9)(41). En este grupo de pacientes, *A. baumannii* puede suponer hasta el 27% de las etiologías de la neumonía asociada a ventilación mecánica (41)(42).

En las neumonías nosocomiales producidas por *A. baumannii*, los factores de riesgo más relevantes son la intubación orotraqueal, la traqueostomía, la antibioterapia previa, la mayor duración de la estancia en UCI, la cirugía reciente, la presencia de enfermedad pulmonar crónica subyacente y la propensión para la aspiración de secreciones altas (9) (38)(43).

La neumonía nosocomial por *A. baumannii* suele ser multilobar y puede desarrollar complicaciones como derrame pleural paraneumónico, cavitación y fístula broncopleural. Se acompañan de bacteriemia en torno al 12% de los episodios, siendo la neumonía el foco clínico más frecuente de la misma en general (44).

En el entorno nosocomial, también es frecuente la traqueobronquitis por *A. baumannii*. Durante los últimos años, se ha venido prestando mayor atención a la traqueobronquitis asociada a ventilación mecánica como entidad clínica, aunque los criterios diagnósticos no están completamente consensuados y su impacto clínico está relacionado, en muchas ocasiones, con el ulterior desarrollo de una neumonía (45).

Por otra parte, entre los pacientes en los que se aísla *A. baumannii* durante la hospitalización, un número importante representan colonizaciones. Así, en una cohorte multicéntrica española con 221 aislamientos clínicos de *A. baumannii*, el 52,9% eran causantes de infección, mientras que el 47,1% eran colonizantes (46). Más allá de su papel como paso previo a la infección respiratoria, se desconoce si la colonización por *A. baumannii* tiene algún impacto clínico por sí misma. El comportamiento de la colonización respiratoria por *A. baumannii* está pobremente descrito en la literatura.

1.3.2.2 Bacteriemia.

La bacteriemia es la segunda infección nosocomial en frecuencia producida por *A. baumannii* (9). La neumonía constituye el foco clínico más frecuentemente asociado a ella (44), seguido por los catéteres intravenosos (47)(48). Otros orígenes, como el tracto urinario, las infecciones de piel y partes blandas, la meningitis nosocomial o las infecciones intraabdominales son focos menos frecuentes (47)(48). Hasta en el 44% de los episodios, el origen de la bacteriemia es desconocido (49).

La frecuencia de bacteriemias por *A. baumannii* es un parámetro que puede servir de expresión del aumento de infecciones por este microorganismo en los últimos años. En un estudio realizado en nuestro centro durante 1993, *A. baumannii* fue el microorganismo responsable del 27% de las bacteriemias por bacilos gramnegativos (48).

Los pacientes con mayor riesgo de tener una bacteriemia por *A. baumannii* son aquellos que están ingresados en UCI, tanto de adultos como pediátrica, y los que tienen un índice de Charlson >3 puntos, hospitalizaciones previas, nutrición parenteral total, tratamiento quimioterápico o han recibido antibioterapia durante el ingreso, especialmente β -lactámicos o carbapenemas (26)(47)(48)(49)(50)(51). Entre los factores de riesgo para padecer una bacteriemia por *A. baumannii*, se encuentran en lugar preferente la presencia de dispositivos o procedimientos invasivos como ventilación mecánica, catéter intravascular, sonda vesical o sonda nasogástrica, según ha reflejado múltiples estudios y la reciente revisión sistemática realizada por Zhou *et al.* (52).

1.4 Pronóstico de las infecciones producidas por *Acinetobacter baumannii*.

La mortalidad cruda y la morbilidad asociadas a las infecciones por *A. baumannii*, aunque varían en función del tiempo de infección y de otros factores, son elevadas. En muchas ocasiones, no obstante, es difícil conocer la mortalidad atribuible, al producirse mayoritariamente en pacientes con enfermedades graves subyacentes o situaciones críticas.

En los últimos años, abundan los estudios sobre factores relacionados con el pronóstico de las infecciones por *A. baumannii*, habiéndose identificado como tales aspectos relativos al huésped (gravedad de la enfermedad basal, situación funcional previa, ventilación mecánica, neoplasia maligna, inmunosupresión), factores relacionados con la infección (localización de la misma, *scores* de gravedad, shock séptico, distrés respiratorio), eficacia del tratamiento empleado y, finalmente, también características del microorganismo, como la infección por un clon específico o las resistencias antibióticas (53)(54)(55).

La resistencia a carbapenemas es uno de los factores que con más frecuencia se ha asociado con un exceso de mortalidad en las infecciones producidas por *A. baumannii* (56)(57), cuantificado con una OR=2,22 (IC95% 1,66-2,98) en el meta-análisis que llevaron a cabo Lemos *et al.* (57). Sin embargo, los estudios al respecto son bastante heterogéneos y no está aclarado hasta qué punto existen factores de confusión, como la proporción de tratamiento inapropiado.

1.4.1 Mortalidad y morbilidad asociadas a la neumonía por *Acinetobacter*. Factores pronósticos.

La mortalidad cruda de la neumonía por *A. baumannii* es elevada, alcanzando hasta el 40%-70% en la neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVM) (46)(58). No obstante, respecto a la NAVM, se han comunicado resultados contradictorios sobre el impacto de *A. baumannii* como agente etiológico, por lo que el debate científico sobre la mortalidad atribuible a estas infecciones y, consecuentemente, si los pacientes fallecen por o con la infección causada por esta bacteria, es causa de controversia (59)(46)(60). Revisiones relativamente recientes han descrito una mortalidad atribuible del 8-23% para la neumonía nosocomial por *A. baumannii* y del 10-46% para la NAVM (61)(62).

La relevancia clínica de la colonización, al menos cuando ocurre en vías aéreas, no se conoce, pero necesita ser dilucidada a tenor de los datos derivados de un estudio realizado en pacientes colonizados en vías aéreas por *P. aeruginosa*, el

cual mostró que la mortalidad era significativamente superior en pacientes con alta concentración de bacterias en el aspirado endotraqueal, aún sin NAVM, que en aquellos con NAVM. En este sentido, es de interés constatar que un estudio retrospectivo de casos y controles, que comparó todos los pacientes colonizados o infectados por *A. baumannii* MDR con aquellos colonizados o infectados por *P. aeruginosa* MDR mostró un aumento de mortalidad en el grupo de *A. baumannii* ($p=0,0002$) (63).

Se han identificado múltiples factores de riesgo de mortalidad de la neumonía nosocomial por *A. baumannii*: las enfermedades crónicas subyacentes, la gravedad clínica de la neumonía o de la situación basal medida con distintos *scores*, el tratamiento empírico inapropiado o el uso de antimicrobianos en los 28 días previos son los más importantes (54)(64)(65). La resistencia a carbapenemas se ha relacionado con la mortalidad en algunos estudios, como el de Zheng *et al.* (54), en el que los pacientes con neumonía nosocomial por *A. baumannii* resistente a carbapenemas presentaban una mortalidad superior a aquellos con neumonías por *A. baumannii* sensible (45,6% vs. 29,9%, $p=0,02$); en este caso, sin embargo, la resistencia de la cepa causal no se seleccionó como factor de riesgo de mortalidad en el análisis multivariante, mientras que sí lo hizo el tratamiento inapropiado, sugiriendo que la dificultad para establecer un tratamiento adecuado es lo que aumenta la mortalidad de las infecciones por *A. baumannii* resistente a carbapenemas.

1.4.2 Mortalidad y morbilidad asociadas a la bacteriemia por *Acinetobacter*. Factores pronósticos.

La mortalidad cruda de la bacteriemia por *A. baumannii* es elevada, habiéndose comunicado cifras que varían en estudios recientes entre el 20% y el 69,9%, según la serie y la distribución de factores de riesgo (54)(58)(68) (67)(91)(68). Su pronóstico es peor que el de la bacteriemia por otras genopecies del género *Acinetobacter*. A este respecto, Lee *et al.* (69) detectaron una mortalidad cruda a 30 días del 29,7% para la bacteriemia por *A. baumannii*, con una OR=2,23 (IC95%1,053-4,821) respecto a la mortalidad de las bacteriemias por otras especies de *Acinetobacter*.

Respecto a la mortalidad atribuible existen resultados discordantes. En un estudio retrospectivo de casos y controles, Blot *et al.* (70), no encontraron diferencias significativas en la mortalidad; en cambio, otro estudio retrospectivo que comparó pacientes con bacteriemia por *A. baumannii* con controles sin bacteriemia, encontró una mortalidad atribuible del 36,5% (71).

Se han identificado múltiples factores de riesgo asociados a la mortalidad de la bacteriemia por *A. baumannii*, entre los que se cuentan factores similares a los comentados previamente: enfermedad subyacente grave, (en forma de índice de Charlson >3, de neoplasia maligna o de otras enfermedades como EPOC o enfermedad cerebrovascular) de alto grado de dependencia, niveles bajos de albúmina sérica, ingreso en UCI previo a la bacteriemia, cirugía previa o trasplante de órgano sólido en el mismo ingreso, ventilación mecánica, sepsis grave, APACHE II elevado, tratamiento definitivo inapropiado, resistencia a carbapenemas (54)(58)(69)(68)(67)(91)(68) (72). Un estudio que analizó específicamente pacientes con bacteriemia por *A. baumannii* resistente a carbapenemas mostró una mortalidad a los 30 días del 48%. En este estudio, la gravedad de la enfermedad basal y la presencia de inmunosupresión fueron los únicos factores predictores de mortalidad (73). Este estudio no evaluó la sensibilidad a sulbactam, mientras que en el estudio de Chopra *et al.* (68) este aspecto se reveló importante; así, la mortalidad de la bacteriemia por *A. baumannii* resistente a carbapenemas y sulbactam fue del 43% y la producida por *A. baumannii* sensible a alguno de estos β -lactámicos fue del 20%. Nuevamente, el pronóstico parece estar relacionado con las oportunidades de un tratamiento eficaz.

2. Tratamiento de las infecciones por *A. baumannii* en la situación epidemiológica actual.

En la actualidad, la resistencia a la mayoría de los antibióticos disponibles es la norma en los aislados clínicos de *A. baumannii* en hospitales de todo el mundo. Desde su descubrimiento en 1985, las carbapenemas fueron durante mucho tiempo el tratamiento de elección para las cepas de *A. baumannii* multirresistente, pero la diseminación de su uso se ha seguido rápidamente de la aparición y diseminación global de cepas resistentes a estos fármacos. Esto ha motivado que se vuelvan a utilizar fármacos antiguos, desechados inicialmente por su toxicidad, como la colistina, y que se esté dando impulso a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas.

2.1 Perspectiva histórica del desarrollo de resistencias en *Acinetobacter baumannii* y situación epidemiológica actual.

En cuanto a la prevalencia de aislamientos de *A. baumannii* resistentes en España, desde el punto de vista de la resistencia a carbapenemas, un análisis de los resultados del proyecto EPINE en España (1999-2005), mostró unas tasas medias del

34,5%, que además fueron mayores en las UCIs (en las que llegaba al 43,8%), siendo los aislamientos más frecuentes los procedentes de vías respiratorias (41% del total) (74). En un estudio multicéntrico realizado en España en 2010, en 43 centros hospitalarios, entre 456 aislamientos clínicos consecutivos de *A. baumannii*, el 82% de los mismos no eran susceptibles a imipenem (75), mientras que en un estudio similar realizado en 2000, no lo eran el 47,5% de los aislados (76).

Tabla 1. Porcentaje de resistencias a distintos antimicrobianos a lo largo de las dos últimas décadas.

	Vila(77) 1993	Seifert(78) 1993	Shi(79) 1996	Friedland (80) 2003	Fernández- Cuenca(76) 2004	Morfin- Otero(81) 2004	Falagas(82) 2007	Hoban (83) 2007	Morfin- Otero(81) 2009	Sader(84) (USA) 2014	Sader(84) (Europa) 2014
Amikacina	28	64	28	13	66	16	86	22	48	51	66
Ampicilina	98	91	88	-	98	-	-	-	-	-	-
Ampicilina+ Sulbactam	48	-	34	21	54	-	49	-	-	-	-
Ceftazidima	45	32	42	45	85	48	88	97	61	68	82
Ciprofloxacino /Levofloxacino	30	94	4	57	90	44	93	97	55	72	82
Colistina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	3
Imipenem /Meropenem	-	-	2	5	48	-	71	38	47	66	72
Minociclina /Doxiciclina	2	-	-	-	35	3	-	7	9	35	37
Piperacilina+ Tazobactam	67	36	72	-	95	32	-	-	61	70	80
Tigeciclina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	2
Tobramicina	50	98	-	25	79	-	-	-	-	-	-

2.2. Antibióticos con actividad frente a *A. baumannii* multirresistente (MDR).

2.2.1. Carbapenemas.

Las carbapenemas (imipenem, meropenem y doripenem) son los fármacos de elección para los aislados de *A. baumannii* MDR que conservan sensibilidad a carbapenemas (85). Imipenem es el más potente *in vitro* y ha demostrado actividad en modelos animales frente a cepas con una sensibilidad intermedia (CMI = 8 mg/l) (86). Doripenem ha mostrado mayor actividad que meropenem e imipenem frente a cepas de *A. baumannii* con la carbapenemasa *bla*OXA-58 y permanece como opción terapéutica en algunas cepas resistentes a imipenem (87). Sin embargo, la experiencia clínica con este fármaco es aún muy limitada.

El parámetro farmacocinético/farmacodinámico que mejor se relaciona con la eficacia de las carbapenemas es el tiempo por encima de la CMI (88). Por este motivo, se han estudiado la infusión prolongada como estrategia para mejorar este índice (88).

2.2.2. Sulbactam.

Sulbactam posee una actividad inhibidora intrínseca frente a *A. baumannii* y ofrece múltiples ventajas: tiene una buena penetración en tejidos, su perfil de seguridad es excelente y se tolera incluso en dosis elevadas, y la ausencia de actividad en monoterapia frente a la mayoría de otros microorganismos amortigua significativamente la presión antibiótica (89)(90).

La eficacia de sulbactam frente a *A. baumannii* en clínica se sostiene en varios estudios no aleatorizados que, en pacientes con infecciones graves (neumonía asociada a ventilación mecánica, bacteriemia y meningitis, entre otras), han comunicado tasas de éxito terapéutico del 61-67,5% (91). Una revisión sistemática concluyó que los tratamientos con sulbactam tienen la misma eficacia que las terapias basadas en otros antimicrobianos en infecciones por *A. baumannii* (92). Por este motivo, junto con las ventajas referidas previamente, se considera el tratamiento de elección para infecciones por cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenemas y sensibles a sulbactam.

2.2.3. Colistina.

La colistina o polimixina E es un antibiótico polipeptídico, habitualmente disponible en clínica en forma de colistimetato sódico (93). Aunque fue descubierto en la década de 1940, su uso se abandonó al sustituirlo por fármacos menos tóxicos, pero se ha recuperado en los últimos años ante la ausencia de tratamientos disponibles para infecciones por bacilos gramnegativos multirresistentes (94).

Colistina mantiene el nivel más alto de sensibilidad *in vitro* frente a *Acinetobacter baumannii*. No obstante, la emergencia de cepas resistentes a colistina es preocupante y se han comunicado brotes por cepas de *A. baumannii* pan-resistente (95)(96), así como aparición de aislados con heterorresistencia a colistina (94)(97). Su relevancia en clínica no está aclarada, pero estudios *in vitro* han mostrado que el desarrollo de heterorresistencia se relaciona con concentraciones subterapéuticas de colistina (98)(99). Entre los mecanismos de resistencia a colistina, se han descrito mutaciones que producen pérdida del lipopolisacárido (*lpxA*, *lpxC*, *lpxD*) y otras que lo inactivan mediante la adición de fosfoetanolamina (*pmrAB*) (100).

Los estudios que han evaluado la eficacia de colistina son numerosos pero muy heterogéneos, y la mayoría proporcionan una evidencia de baja calidad. En la revisión sistemática realizada por Yahav *et al.* (94) en 2010 se incluyeron todos los estudios que habían comparado la eficacia de colistina, sola o en combinación, con otros

antibióticos en infecciones diversas y por distintos microorganismos. El análisis global favorecía a los comparadores. Más recientemente, Liu *et al.* (101) llevaron a cabo un meta-análisis para evaluar específicamente los datos de eficacia y seguridad de las polimixinas en el tratamiento de las infecciones por *A. baumannii*. En dicho análisis, las tasas de respuesta clínica y microbiológica, la mortalidad y la duración de la estancia hospitalaria presentaron una diferencia no significativa a favor del uso de polimixinas.

La dosificación está en proceso de revisión, ya que la actualmente recogida en ficha técnica se ha demostrado inapropiada en términos de eficacia y selección de cepas resistentes (102)(103). En los últimos años, diversos estudios farmacocinéticos han puesto de manifiesto que se necesitan dosis de carga y una dosis diaria de al menos 9 MU, repartidos en 2-3 veces al día, para alcanzar el objetivo farmacodinámico en aislados clínicos sensibles con las CMI habituales (103)(104).

2.2.4. Tigeciclina.

Tigeciclina es un antibiótico de amplio espectro del grupo de las gliciliclinas. Presenta actividad frente a la mayoría de los aislados de *A. baumannii* extremadamente resistentes, incluidos los resistentes a carbapenemas. Basándose en ensayos clínicos, su uso está aprobado para infecciones de piel y partes blandas, infecciones intraabdominales y neumonías adquiridas en la comunidad (105). Cuando se ha utilizado para tratar otras infecciones, como la neumonía asociada a ventilación mecánica, el éxito terapéutico ha sido variable (106)(107).

2.2.5. Otros.

Los aminoglucósidos mantienen un porcentaje moderado de cepas sensibles. No se consideran tratamiento de primera línea por su escasa penetración en algunos tejidos (pulmón, sistema nervioso central) (108), su toxicidad renal y ototoxicidad, y por su menor eficacia en monoterapia respecto a otros antimicrobianos (109). La rifampicina mantiene elevada actividad *in vitro* frente a *Acinetobacter*. Existen datos de eficacia *in vivo* procedente de modelos animales, pero no hay estudios clínicos que la avalen(110)(111).

2.2.6. Tratamiento combinado.

Se han propuesto múltiples combinaciones, pero los estudios realizados son heterogéneos y el nivel de evidencia es bajo. La mayoría de los estudios son ensayos

in vitro y en modelos animales (112). Los meta-análisis realizados a partir de estudios clínicos no han demostrado beneficio de la terapia combinada respecto a la monoterapia con fármacos de primera línea, cuando estos están disponibles (113)(114). Aunque los resultados podrían ser diferentes para cepas con resistencia a antimicrobianos de primera línea (115), los resultados obtenidos con terapia combinada de rescate durante un brote de *A. baumannii* multirresistente no apoyan buenos resultados con la misma (95).

2.3. Terapias emergentes.

Urge encontrar alternativas terapéuticas, dada la emergencia de cepas resistentes. Entre ellos destacan los péptidos con actividad antimicrobiana y la terapia de base inmunitaria. Los péptidos son un componente natural de la inmunidad innata (116). Aunque algunas moléculas presentan un efecto prometedor en estudios experimentales, hay muchos aspectos por desarrollar (seguridad, dosificación) antes de llevarlos a la práctica clínica. La inmunización activa o pasiva ha comenzado a investigarse como una terapia alternativa para *A. baumannii* (117). Su principal interés potencial es que el efecto sería independiente del perfil de resistencia de las cepas. Hasta la fecha, solo se han llegado a realizar modelos animales. Sus resultados prometedores indican que podría ser una terapia relevante en los próximos años. Actualmente, está en ritmo creciente la búsqueda de moléculas que bloqueen factores de virulencia.

3. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en *Acinetobacter baumannii*.

Una de las características que hace de *A. baumannii* un patógeno nosocomial de notable importancia es su capacidad para desarrollar múltiples resistencias antibióticas, siendo MDR la mayoría de las cepas clínicas que se aíslan en la actualidad. Los mecanismos que contribuyen a este fenotipo de multirresistencia son variados: reducción de la permeabilidad de las proteínas de membrana externa, sobreexpresión de bombas de eflujo y adquisición de elementos genéticos portadores de determinantes de resistencia, como plásmidos, integrones, transposones e islas de resistencia.

Tabla 2. Mecanismos de resistencia de *A. baumannii*.

Grupo antibiótico	Mecanismo de resistencia	Ejemplos
β-lactámicos	Inactivación enzimática	β-lactamasas (AmpC, TEM, VEB*, PER, CTX-M, SHV) Carbapenemasas (OXA-23, -40, -51, -58 -143-like; VIM, IMP, NDM-1; -2, ADC-68)
	Expresión reducida de proteínas de membrana externa	CarO, 33–36 kDa, OprD-like
	Alteración en la expresión de las PBPs	PBP2
	Bombas de eflujo	AdeABC
Fluorquinolonas	Diana modificada	Mutaciones en <i>gyrA</i> y <i>parC</i>
	Bombas de eflujo	AdeABC, AdeM
Aminoglucósidos	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	AAC, ANT, APH
	Bombas de eflujo	AdeABC, AdeM
	Metilación ribosomal	ArmA
Tetraciclinas	Bombas de eflujo	AdeABC, TetA, TetB
	Protección ribosomal	TetM
Glicilciclinas	Bombas de eflujo	AdeABC
Polimixinas (colistina)	Diana modificada	Mutaciones en PmrA/B (modificación LPS), mutaciones en los genes de biosíntesis de LPS

Tabla modificada de McConnell *et al.* (118)

3.1 Importancia de la resistencia a carbapenemas en *Acinetobacter baumannii*.

Imipenem ha sido la terapia estándar para *A. baumannii*. Sin embargo, desde el final del siglo XX, la frecuencia de las infecciones causadas por *A. baumannii* resistente a carbapenemas ha aumentado de manera alarmante (119). Como comentábamos en el epígrafe 1.4, esta resistencia se relaciona con un peor pronóstico de los pacientes con infecciones por *A. baumannii*, aunque en ocasiones no sea fácil

interpretar si ello es debido a la mayor probabilidad de un tratamiento incorrecto o a mayor virulencia de las cepas resistentes.

3.2 Principales mecanismos de resistencia a carbapenemas en *Acinetobacter baumannii*.

Entre los mecanismos de resistencia a imipenem descritos en *A. baumannii* se encuentran la síntesis de carbapenemasas, la disminución en la permeabilidad de la membrana externa causada por una disminución en la expresión de las porinas y la alteración en la expresión de las proteínas de unión a penicilina (PBPs). La producción de carbapenemasas es el mecanismo más común (120).

3.2.1 Carbapenemasas.

En la mayoría de los casos, la resistencia a carbapenemas en *A. baumannii* está asociada con la síntesis de las oxacilinasas con actividad frente a este grupo de fármacos. En *A. baumannii* se han identificado cinco grupos filogenéticos de estas carbapenemasas: *bla*OXA-58, *bla*OXA-24/40, *bla*OXA-23, *bla*OXA-51/69 y la más recientemente descrita OXA-143 (55). Con una frecuencia inferior, se han descrito cepas productoras de metalo- β -lactamasas (MBL) tipo IMP, VIM, SIM y NDM (121)(122).

La primera carbapenemasa en ser descrita fue *bla*OXA-23, a partir de un plásmido de un aislado de *A. baumannii* en Escocia (123), seguida de *bla*OXA-24/40, que se describió en el genoma cromosómico de un aislado clínico español de *A. baumannii* (124). El tercer *cluster* de oxacilinasas adquiridas en ser descrito fue *bla*OXA-58; su gen suele encontrarse en plásmidos, lo que explica su amplia distribución por todo el mundo (125). La última en ser identificada fue *bla*OXA-143, a partir de un aislado de *A. baumannii* de Brasil (31). Experimentos con cepas *knock-out* y plásmidos portadores de los genes de estas carbapenemasas han confirmado que estas confieren resistencia a carbapenemas, siendo de mayor nivel para *bla*OXA-23 y *bla*OXA-40 que para *bla*OXA-58 (127)(128).

La carbapenemasa *bla*OXA-51 es constitutiva de *A. baumannii*: todos sus homólogos son codificados por el genoma bacteriano y están presentes en todas las cepas. Sin embargo, los niveles de expresión basal de *bla*OXA-51 no son suficientes para conferir resistencia a carbapenemas. La inserción de una secuencia *ISAba1* (la más frecuente), *ISAba9* o *ISAba825* delante de *bla*OXA-51 aumenta su síntesis hasta niveles que sí generan resistencia a carbapenemas (129)(130)(131). En algunos

casos, a pesar incluso de este incremento, la expresión de OXA-51 por sí sola puede ser insuficiente para que las cepas alcancen resistencia a imipenem (121).

Las MBL hidrolizan todos los β -lactámicos menos aztreonam (132). Estas carbapenemasas son mucho menos prevalentes que las oxacilinasas, pero confieren una actividad hidrolítica de carbapenemas notablemente superior (120). Con excepción de las NDM, las MBL típicamente se identifican dentro de integrones de clase 1 que contienen un *array of resistance gene cassettes*, que normalmente incluyen algunos determinantes de resistencia a aminoglucósidos (133). Todas las MBL se han descrito igualmente en otros bacilos gramnegativos, fundamentalmente *P. aeruginosa* y enterobacterias. IMP fue la primera en ser identificada y, de todas las variantes que existen, se han identificado 8 en *A. baumannii* (IMP-1, -2, -4, -5, -6, -8, -11 y -19) (134). VIM tiene mayor afinidad por las carbapenemas que IMP. Se han descrito cinco variantes en *A. baumannii* (VIM-1, -2, -3, -4 y -11), especialmente en países europeos y asiáticos (134). Hasta la fecha, solo se ha descrito una variante de SIM (SIM-1) en una cepa de *A. baumannii* en 2005; su actividad es similar a la de IMP y VIM (134). NDM ha sido la más recientemente detectada. Se describió inicialmente en aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* de un viajero procedente de India (135). De la misma forma que otras, esta MBL confiere resistencia a todos los β -lactámicos menos aztreonam. Se describió por primera vez en *A. baumannii* en 2010, a partir de una cepa clínica de Nueva Delhi que también contenía *blaOXA-23* y *armA* (122). Posteriormente se describió NMD-2 en un aislado de *A. baumannii* en Egipto, con similar configuración e igual actividad que NMD-1(134).

En un estudio reciente se ha descrito por primera vez la carbapenemasa de clase C ADC-68 en un aislado de *A. baumannii* resistente a penicilinas, cefalosporinas y carbapenemas (136).

Aunque la prevalencia es variable. La diseminación de las oxacilinasas es global. En cuanto a las MBL, son más infrecuentes, pero también se está produciendo una diseminación internacional con numerosas comunicaciones al año. En España, varios estudios multicéntricos realizados con aislados procedentes de distintos hospitales revelan que la resistencia de *A. baumannii* en nuestro medio se debe mayoritariamente a *blaOXA-40* y *blaOXA-58* (137)(138). Se ha descrito casos puntuales de *A. baumannii* productor de *blaOXA-23* en hospitales españoles (139)(140)(141) y, hasta la fecha, ninguno de MBL. Las cepas de *A. baumannii* portadoras de *blaOXA-143*(126) cuentan aun con un número de casos mundial muy reducido y ninguno declarado en España.

3.2.2 Cambios en la permeabilidad de membrana.

La disminución en la permeabilidad de la membrana externa por una reducción en la expresión de porinas es el segundo mecanismo en frecuencia que confiere resistencia a carbapenemas en *A. baumannii*. No obstante, se suele presentar asociado a otros mecanismos. Aunque no es bien conocido, se han descrito varias proteínas de la membrana externa con funcionamiento de porinas asociadas a resistencia a carbapenemas: la proteína 33-36 kDa, la 25-29 KDa CarO y OprD-like (142). CarO es la mejor descrita, tiene dos isoformas (CarOa y CarOb) y se relacionó con la resistencia a imipenem y meropenem en el primer estudio que la identificó en *A. baumannii* (143). Posteriormente, al profundizar en su estudio, se han descrito varios subtipos, así como la existencia de un sitio de unión con alta afinidad para imipenem, que es más específico en el subtipo CarOb (144). El mecanismo por el que una reducción en el número de CarO en la membrana externa de *A. baumannii* reduce la sensibilidad a meropenem no se ha llegado a identificar hasta el presente.

3.2.3 Alteración en la expresión de las PBP.

La alteración en la expresión de PBPs también se ha descrito como un mecanismo de resistencia a carbapenemas no enzimático, aunque no ha sido caracterizado completamente. Su contribución al nivel global de resistencia a carbapenemas suele ser marginal. En estudios ya antiguos, la resistencia de algunas cepas de *A. baumannii* a carbapenemas se ha asociado a la sobreexpresión de PBP con baja afinidad por las carbapenemas en ausencia de otro mecanismo de resistencia conocido (145). En cambio, en un trabajo reciente de Fernández-Cuenca *et al.* (146) se describieron doce patrones distintos de expresión de PBPs en aislados clínicos de *A. baumannii* con resistencia a imipenem. La expresión reducida de PBP2 se asoció con resistencia a carbapenemas.

3.2.4 Sistemas de expulsión activa: bombas de eflujo.

La contribución de las tres bombas de eflujo identificadas en *A. baumannii* (AdeABC, AdeIJK y AdeFGH) a la resistencia a β -lactámicos en general y a carbapenemas en particular no ha sido bien caracterizado. Wong *et al.* (147) mostraron que la disrupción de *adeB* en tres cepas de *A. baumannii* alteraba significativamente la sensibilidad a meropenem pero no a imipenem y, más recientemente, Roca *et al.* caracterizaron una bomba AdeABC-type en un aislado de *A. nosocomialis*, que era capaz de expulsar monobactams, cefalosporinas de tercera

generación, cefoxitina y meropenem pero, de nuevo, no imipenem (148). En general, la expulsión activa de carbapenemas puede producir pequeños incrementos de CMI, pero un alto nivel de resistencia solo se puede alcanzar con la combinación con mecanismos de resistencia adicionales.

4. Mecanismos de patogenicidad y virulencia de *Acinetobacter baumannii*.

La mayoría de las infecciones y muertes asociadas a *A. baumannii* se producen, como hemos visto antes, en pacientes que ya están gravemente enfermos por otra causa, han recibido antibioterapia y han adquirido esta bacteria en el hospital. Estos datos contribuyen a que *A. baumannii* sea considerado un microorganismo menos virulento que otros bacilos gramnegativos como *P. aeruginosa* o *K. pneumoniae* (149). Sin embargo, la capacidad patógena de *A. baumannii* precisa de múltiples factores de virulencia, necesarios para que esta bacteria colonice o infecte eficientemente al huésped. A pesar de la importancia clínica y la diseminación global de *A. baumannii*, han existido muy pocos estudios, hasta hace escasos años, sobre los factores de virulencia de *A. baumannii* y la respuesta del huésped a la infección (150). Esta tendencia está cambiando, gracias en parte a la disponibilidad de secuencias genómicas completas y de técnicas moleculares que permiten manipular el genoma bacteriano, así como al ensayo con modelos animales (118).

Considerando que *A. baumannii* es un microorganismo multirresistente, la identificación de sus mecanismos de patogenicidad y sus factores de virulencia podría contribuir al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el control de las infecciones por *A. baumannii*.

4.1 Adherencia y formación de biofilm.

A. baumannii tiene la capacidad de adherirse a todo tipo de superficies inertes y biológicas, entre las que se encuentran los epitelios humanos o filamentos de *Candida albicans* (151). Esta adherencia es variable en distintos aislados clínicos, habiéndose encontrado que las cepas pertenecientes al clon europeo II se adhieren mejor al epitelio bronquial que las pertenecientes al clon europeo I (151). La adherencia a las células del huésped representa el paso inicial de la colonización o infección. En muchas ocasiones, el biofilm se forma en la superficie de dispositivos médicos como tubos endotraqueales, catéteres endovasculares o sondas vesicales, manteniéndolos como reservorios y origen de posteriores infecciones. La capacidad de

producción de biofilm y la de adherencia a células epiteliales no se correlacionan en aislados clínicos de *A. baumannii*, lo que hace presumir que los mecanismos implicados en la regulación de ambas formas de colonización son diferentes (152).

Generalmente, durante la colonización de superficies biológicas o inertes, la bacteria forma microcolonias que resultan en una comunidad altamente estructurada conocida como biofilm. Este se constituye como una estructura tridimensional compleja formada por múltiples bacterias en contacto íntimo unas con otras, asociadas con la superficie sobre la que se forma el biofilm, y encajadas en una matriz polimérica de carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y otras macromoléculas (153). Algunos aislados clínicos de *A. baumannii* tienen la capacidad de formar biopelícula en la superficie de medios líquidos (154).

La producción de biofilm confiere a las bacterias una serie de ventajas respecto a sus homólogos en forma planctónica, proporcionando una organización estructural que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del huésped, tales como opsonización, lisis por complemento y fagocitosis (155). El biofilm permite, además, sobrevivir durante largos periodos de tiempo a la desecación y la falta de nutrientes (156)(157), como se muestra en los datos de Espinal *et al.* (157), quienes encontraron que la supervivencia sobre vidrio de cepas de *A. baumannii* productoras y no productoras de biofilm fue significativamente superior en las primeras (36 vs. 15 días, respectivamente). Diversos estudios revelan además que las bacterias en biofilm son más resistentes a los antibióticos que las bacterias libres. Lee *et al.* (158) mostraron una relación directa entre la expresión de la betalactamasa PER-1 y la capacidad de adhesión y de producir biofilm sobre células epiteliales de cepas clínicas de *A. baumannii* multirresistentes (158).

La formación de biofilm sobre superficies inertes es bastante variable entre distintos aislados de *A. baumannii*, sin que exista una correlación aparente entre la naturaleza de los diferentes tipos de sustrato y las propiedades de la superficie bacteriana (154). Además, existen variaciones significativas tanto en la cantidad de biofilm que se forma en las superficies inertes como en la disposición que adoptan las células que lo conforman. En algunos casos, son simples monocapas de bacterias, mientras que en otros se disponen en complejas estructuras multi-capa encajadas en la matriz extracelular (154). No obstante, la formación de biofilm puede estar influenciada por diferentes factores, como la disponibilidad de nutrientes, los componentes de la superficie bacteriana, el *quorum sensing* o la secreción de macromoléculas. Complejas redes reguladoras se encargan de expresar productos

relacionados con la generación de biofilm en respuesta a señales del medio externo (118)(134).

Se han identificado distintos mecanismos genéticos y celulares relacionados con la capacidad de formar biofilm y de adherirse a superficies inertes de *A. baumannii*. A este respecto, Tomaras *et al.* (159) demostraron en la cepa ATCC 19606 de *A. baumannii* que su capacidad para formar pili y adherirse y formar biofilm dependía de la expresión del gen *csuE*, un componente del complejo de las chaperonas (*chaperone-usheer complex*) *CsuA/BABCDE*, importante para el ensamblaje y producción de pili relacionados con la adhesión a superficies. La inactivación de *csuE* en esta cepa abolía la producción de pili y la formación de biofilm, sugiriendo que aquellos juegan algún papel en los pasos iniciales de formación de este. La expresión de este operón está controlada por un sistema regulador que incluye una *sensor kinase* codificada por *bfmS* y un regulador de la respuesta codificado por *bfmR*. La inactivación de *bfmR* resulta en una pérdida de expresión del operón *csuA/BABCDE* y pérdida de producción de pili y formación de biofilm (160). En cambio, la inactivación del gen de *bfmS* produce como resultado la disminución, pero no abolición, de la formación de biofilm sobre superficies inertes (160), pero abole la adhesión a células eucariotas (161). El operón *CsuA/BABCDE* está muy diseminado, por lo que estos pili podrían ser un factor relacionado con la formación de biofilm frecuente en aislados clínicos, pero además de ellos, de Breij *et al.* (156) encontraron que *A. baumannii* ATCC19606 produce pili independientes de *CsuA/BABCDE*, que podrían estar implicados en la adherencia de la bacteria a superficies biológicas, como las células respiratorias humanas. Más recientemente, se ha observado que la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, que no produce *CsuA/B* (subunidad de los pili mediados por *CsuA/BABCDE*), forma estructuras de biofilm mucho más finas que la ATCC 19606 (118).

Se han identificado también mecanismos no relacionado con los pili. Loehfelm *et al.* describieron un ortólogo de la proteína estafilocócica asociada al biofilm (Bap) en la cepa de *A. baumannii* 307-0294. La inactivación del transposon de esta proteína implicada en las interacciones célula-célula resulta en una desestabilización del biofilm maduro en todo tipo de superficies (162). El análisis por microscopía electrónica de Bap ha mostrado que esta proteína es necesaria para la estructura tridimensional del biofilm y para formar canales de agua(163). Goh *et al.* (164) mostraron que el gen que codifica Bap es muy prevalente (90% de las cepas estudiadas), tras analizar múltiples cepas de distintos linajes. El desarrollo y maduración del biofilm también depende de

sistemas de O-glicosilación y de la capacidad de producir y segregar poli- β -1,6-N-acetilglucosamina (165)(166).

La mayoría de estudios sobre mecanismos asociados a la formación de biofilm están realizados con superficies inertes, estando mucho menos investigados los que explican la capacidad de *A. baumannii* de adherirse a superficies biológicas. Se conoce que en el proceso de adherencia de *A. baumannii* a células epiteliales y filamentos de *C. albicans* está implicada la proteína de membrana externa OmpA (167). La interacción entre la ATCC 19606 y filamentos de *C. albicans* es independiente del sistema de pili mediados por el sistema *csu* (118). Estos datos sugieren que no hay relación directa entre la capacidad de formación de biofilm en superficies inertes y biológicas.

Una de las principales limitaciones para conocer los mecanismos genéticos responsables de la formación de biofilm es la gran variabilidad que existe entre cepas, lo que debe ser tenido en cuenta para interpretar los resultados de estudios realizados sobre cepas diferentes.

4.2 Motilidad en superficie y adherencia.

A. baumannii fue inicialmente descrito como una bacteria no móvil debido a su carencia de flagelos, lo que le impediría “nadar” en medios líquidos como hacen otras especies bacterianas (168). Posteriores estudios de secuenciación del genoma de *A. baumannii* han corroborado la ausencia de genes relacionados con los flagelos. Sin embargo, *A. baumannii* se disemina rápidamente por las superficies y se ha comprobado que algunas cepas tienen la capacidad de moverse en la superficie de medios semi-sólidos (Figura 1).

Aunque no existe una evidencia experimental directa, se cree que este tipo de motilidad está mediada, al menos en parte, por extensión y retracción de pili tipo IV (169), análogamente a lo que ocurre con *A. calcoaceticus*, en el que la presencia de fimbrias se relaciona con su motilidad (170). Esta hipótesis se encuentra apoyada por varias evidencias experimentales. Se han detectado genes relacionados con el ensamblaje y funcionamiento de los pili IV tras secuenciar distintas cepas de *A. baumannii* (171). Estos autores demostraron además una correlación positiva entre el

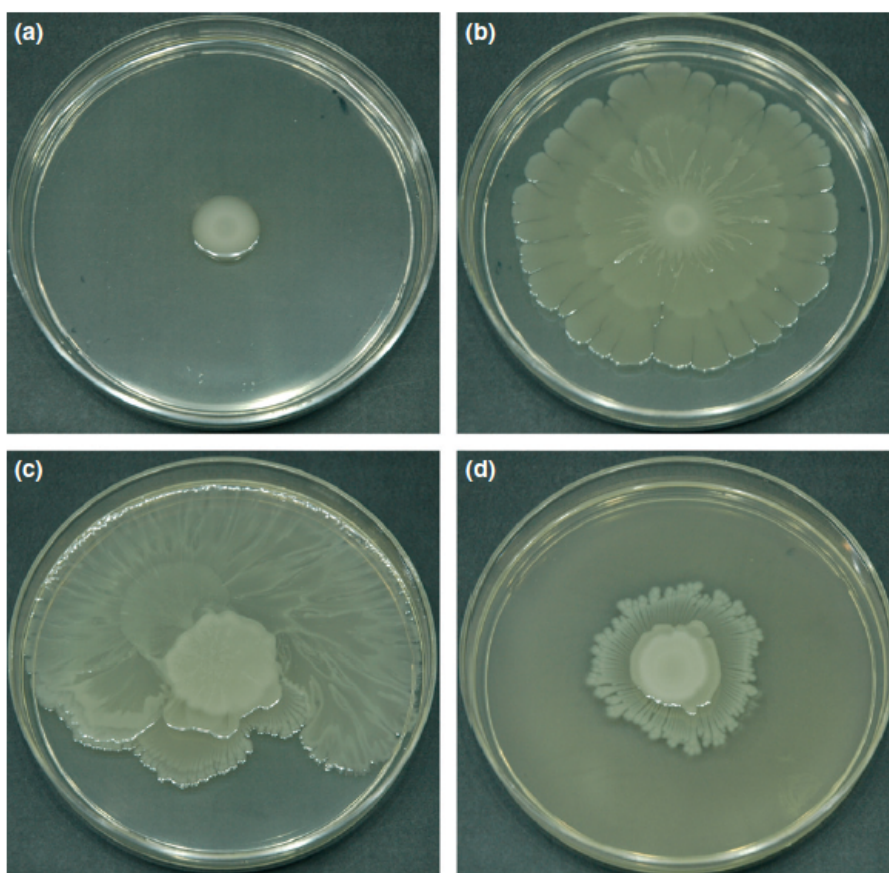


Figura 1. Motilidad en superficie de *A. baumannii* sobre medio semi-sólido. Las suspensiones contenían a) la cepa ATCC 19606 (no móvil) y b-d) distintos aislados clínicos clonalmente distintos.

grado de conservación de la secuencia del gen que codifica la subunidad *pilA* y el fenotipo de motilidad que exhibían las cepas (171). En otro estudio, Clemmer *et al.* (172) encontraron que la inactivación del gen *pilT*, que codifica una ATPasa relacionada con la retracción de los pili en otras bacterias (173), se asoció una reducción del 54% de la motilidad en una cepa de *A. baumannii*. No obstante, el hecho de que aún persistiera un cierto grado de motilidad sugiere que existen otros mecanismos responsables diferentes a los pili, aún no bien identificados. Wilharm *et al.* encontraron que *A. baumannii* adquiere ADN del medio durante el movimiento sobre las superficies. Esta es una de las principales características de *A. baumannii*: la adquisición e integración de ADN, que le permiten desarrollar fácilmente resistencias antibióticas. Según los resultados de este estudio, ambos mecanismos dependerían del correcto funcionamiento de los pili IV (174).

La motilidad de *A. baumannii* es un fenotipo lábil que se ve muy influenciado por las condiciones del medio externo. En estudios *in vitro*, solamente se produce

sobre medios semisólidos, y disminuye según aumenta la concentración de agar o agarosa en los medios de cultivo (154)(172). La disponibilidad de hierro libre en el medio (171), la densidad celular o la luz también influyen significativamente sobre la motilidad (172).

Si la motilidad tiene o no un rol significativo en la patogenicidad o virulencia de *A. baumannii* en el huésped humano es una cuestión por aclarar. No todos los aislados clínicos de *A. baumannii* la presentan cuando se analiza *in vitro* y faltan datos de modelos animales que puedan esclarecer las posibles diferencias entre cepas con y sin motilidad.

4.3 Adquisición de hierro.

Debido a la escasez de hierro férrico en los medios biológicos, un ión fundamental para el crecimiento bacteriano, la mayoría de las bacterias aerobias han desarrollado sistemas de alta afinidad de captación de hierro, que fundamentalmente incluyen la producción, emisión al medio y recaptación de quelantes conocidos como sideróforos (175). *A. baumannii* puede adquirir iones en estado férrico a través de sideróforos, siendo acinetobactina el sistema mejor caracterizado (176)(177)(178). Análisis genómicos recientes sugieren, no obstante, que *A. baumannii* podría contener más de un *locus* implicado en la biosíntesis de sideróforos, como sugieren algunos análisis genómicos (169)(179). Se ha demostrado además que *A. baumannii* tiene la capacidad de utilizar el grupo hemo como fuente de hierro (180), así como sistemas para captar y utilizar iones en estado ferroso (66).

Respecto a la relación entre la captación de hierro y la capacidad de producir infección, un estudio mostró que el sistema mediado por acinetobactina juega un papel crítico en la capacidad de *A. baumannii* ATCC 19606 de persistir, causar daño celular y muerte animal utilizando modelos con células humanas epiteliales, con *Galleria mellonella* y con ratón, indicando que las funciones de adquisición de hierro juegan un papel crítico en la virulencia (181). La escasez de hierro en forma férrica en el medio estimula la producción de sideróforos. En el estudio llevado a cabo por Modarresi *et al.* (182) con cepas clínicas, esta escasez también estimulaba a otros factores de virulencia, incluida la producción de biofilm, ayudando a que el microorganismo sobreviviera en situaciones de escasez de nutrientes. En cambio, esta asociación no es constante, como demuestran los resultados de otros autores.

No existe hasta la fecha ningún estudio que relacione la capacidad de captar hierro con los mecanismos de resistencia a imipenem. Este mecanismo, o bien si el

resto de sistemas de adquisición de hierro se relacionan con la virulencia o proporcionan ventajas ecológicas para la persistencia de *Acinetobacter* en nichos determinados, son cuestiones interesantes pendientes de respuesta (11).

4.4 Hemolisinas.

A. baumannii se ha clasificado históricamente como una bacteria no hemolítica, probablemente por su incapacidad para producir hemólisis en eritrocitos de bovino, contenidos en los medios de cultivo con sangre habituales (90). No obstante, en ensayos hechos con medios con sangre de caballo, algunas cepas de *A. baumannii* presentan actividad hemolítica (184). Esto se correlaciona con la presencia de varios genes codificantes de hemolisinas encontrados en las cepas de *A. baumannii* secuenciadas hasta la fecha, aunque su impacto en la virulencia y la patogenicidad de *Acinetobacter* en el huésped humano no está determinada.

4.5 OmpA.

El factor de virulencia mejor caracterizado para *A. baumannii* hasta la fecha es la proteína de membrana externa OmpA. La primera evidencia de que la proteína OmpA contribuye a la virulencia se obtuvo de una *random transposon mutagenesis screen* que detectó que las cepas de *A. baumannii* mutantes con un déficit de OmpA no eran capaces de inducir la apoptosis de células epiteliales de laringe humana como sus homólogos salvajes (185). En este estudio, se localizó además OmpA purificada en la mitocondria, donde induce la apoptosis a partir de la liberación de moléculas proapoptóticas del citocromo c y del factor inductor de la apoptosis, sugiriendo que esta podría ser la vía mediante la que *A. baumannii* induce daño en las células epiteliales humanas durante la infección.

Esta proteína juega un papel en la formación de biofilm, así como en la adherencia e invasión de células epiteliales, pudiendo participar en la diseminación de *A. baumannii* durante la infección, como se ha demostrado en modelos animales con ratón (186). Su contribución a la formación de biofilm y la motilidad podría facilitar la persistencia y supervivencia de *A. baumannii* como se ha mencionado previamente (167)(160). Igualmente, OmpA juega un papel en la adherencia e invasión de células epiteliales, lo que puede contribuir a la diseminación de *A. baumannii* durante la infección. La carga bacteriana en sangre de ratones con neumonía por *A. baumannii*

inducida experimentalmente fue significativamente mayor en ratones infectados con una cepa salvaje que en aquellos infectados con un mutante (186).

La proteína OmpA contribuye asimismo a la capacidad de *Acinetobacter* de persistir y crecer en suero humano, ya que interacciona con los inhibidores solubles de la vía alternativa del complemento, permitiendo a la bacteria evitar la lisis mediada por el complemento (187). No obstante, es poco probable que OmpA sea el único factor que contribuye a la resistencia sérica, ya que diferentes cepas de *A. baumannii*, que contenían genes putativos de *ompA*, tienen diferentes capacidades de crecimiento y supervivencia en el suero humano (184).

Debido a las múltiples funciones de OmpA en la patogénesis de *A. baumannii*, constituye una diana atractiva para el desarrollo de nuevos tratamientos y estrategias preventivas.

A pesar, no obstante, de sus múltiples funciones en la patogénesis y virulencia de *A. baumannii*, la relación entre la expresión de *ompA* en cepas clínicas y la capacidad para producir infección, especialmente bacteriemia dado su efecto sobre la supervivencia en suero, no ha sido determinada.

4.6. Otros mecanismos.

Como se ha comentado previamente, no todos los mecanismos precisos implicados en el establecimiento y progresión de las infecciones producidas por *Acinetobacter* están claros. Además de los mencionados, los principales mecanismos conocidos hasta la fecha son:

a) La presencia del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular y el lípido A, comunes a otros bacilos gramnegativos, es responsable de producir en modelos experimentales toxicidad letal en ratones y fiebre elevada en conejos (188). La producción de endotoxina *in vivo* es probablemente la responsable de los síntomas que ocurren durante la sepsis por *Acinetobacter*. El LPS actúa sinérgicamente con los exopolisacáridos capsulares, y se ha visto que está envuelto en la resistencia al complemento en el suero humano. Aproximadamente el 30% de las cepas de *Acinetobacter* producen exopolisacáridos que se cree que protegen a la bacteria de las defensas del huésped. Estudios experimentales sugieren que cepas productoras de exopolisacáridos son más patógenas que las no productoras (189). En un modelo con ratón, se ha demostrado que el LPS de *A. baumannii* es el principal componente inmunoestimulador que activa la respuesta inflamatoria durante la neumonía (31).

b) La producción de distintas enzimas que pueden dañar el tejido graso, como la fosfolipasa D y la fosfolipasa C (184).

c) La presencia de una cápsula formada por L-rhamnosa, D-glucosa, D-glucuronato y D-manosa, que hace a la superficie más hidrofílica (190)(191).

d) El *quorum sensing*, un mecanismo regulador en bacilos gramnegativos implicado en importantes funciones bacterianas, tales como formación de biofilm y biosíntesis de enzimas, antibióticos y factores de virulencia extracelulares (192). En cepas clínicas de *Acinetobacter* se han descrito 4 moléculas señales diferentes de *quorum sensing*. Esto podría estar implicado en un mecanismo de autoinducción de múltiples factores de virulencia (189), y podría ser responsable del control de varios procesos metabólicos, incluyendo la formación de biofilm (189).

e) Las vesículas de membrana externa, de unos 200 nm, están compuestas por lipopolisacáridos, proteínas de membrana externa, lípidos y ácidos nucleicos. Estas vesículas, liberadas durante el crecimiento celular, participan en el *quorum sensing*, transportan factores de virulencia, inhiben la maduración de los macrófagos y transfieren material genético (193). OmpA es un componente importante de estas vesículas (186).

d) Las *penicillin binding proteins* (PBPs), enzimas que catalizan la síntesis de peptidoglucano, el componente principal de la pared celular, son necesarias para el crecimiento y mantenimiento celular. Aunque su papel no está totalmente aclarado, contribuyen a la resistencia de *A. baumannii* a la lisis por el complemento (134).

4.7. Importancia clínica de los mecanismos de virulencia.

La mayoría de los estudios realizados sobre factores de virulencia de *A. baumannii* son, como se ha comentado, estudios *in vitro* destinados a identificar factores concretos y determinar su mecanismo de actuación. Tenemos hasta la fecha poca información del impacto clínico sobre pacientes de la infección por aislados con mecanismos de patogenicidad y virulencia concretos. Algunos datos reflejan, no obstante, cómo la variabilidad en estos mecanismos puede determinar el pronóstico clínico. En el estudio de Nutman *et al.* (54), uno de los factores que se relacionó con la mortalidad de la bacteriemia fue el clon de *A. baumannii* que la produjo, lo que hace suponer que existen diferencias en la virulencia de los distintos clones.

Un estudio recientemente publicado describe un *clade* de *A. baumannii* de comportamiento clínico altamente virulento, ya que produjo un brote con un 100% de mortalidad en seis pacientes, la mayoría de ellos sin inmunodepresión importante

(149). Aunque se trataba de aislados extremadamente resistentes, todos los pacientes recibieron tratamiento dirigido apropiado. Este *clade* pertenecía al clon MLST ST10, relativamente infrecuente. A pesar de estar genéticamente relacionadas y del comportamiento clínico similar, los aislados presentaban un genoma heterogéneo en cuanto a factores de virulencia y una virulencia en modelo de ratón variable.

Es preciso profundizar en el conocimiento entre la relación entre factores de virulencia y repercusión clínica, para aclarar qué factores específicos se relacionan con el paso de colonización a infección y con la letalidad de las infecciones.

5. Relación entre mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia, y mecanismos de resistencia.

Existe un debate mantenido acerca de la virulencia de las bacterias multirresistentes en general y de *Acinetobacter baumannii* en particular, partiendo de la creencia común de que la adquisición de resistencia mediante mutaciones o adquisición de nuevos genes se asocia con un alto coste biológico en forma de pérdida de *fitness* y virulencia (194)(195). Por ejemplo, Fernandez-Cuenca *et al.* (196), investigando la virulencia de un aislado de *A. baumannii* panresistente, encontraron asociación entre una virulencia atenuada y la baja expresión de los genes que codificaban las porinas CarO y OprD-like. Los autores atribuyeron la virulencia atenuada al coste biológico que produce la pérdida de ciertas proteínas de membrana externa. Sin embargo, los datos *in vitro* y procedentes de modelos animales no son homogéneos (56).

Se han observado en diversos estudios procesos destinados a estabilizar el impacto de la adquisición de resistencias sobre el *fitness*, incluyendo evoluciones bacterianas en la que el coste de éste se ve aminorado por mutaciones adicionales sin la pérdida de la resistencia. Ejemplo de esto es el trabajo de Moya *et al.* (197), que observaron que la posesión de varios genes *ampD* (*ampDh2* y *ampDh3*) confiere a *P. aeruginosa* un mecanismo de resistencia a β -lactámicos biológicamente eficiente. En cuanto a *A. baumannii*, existen estudios que demuestran cambios en la expresión de proteínas al adquirir resistencia a colistina (94)(199), así como una disminución en el *fitness* bacteriano de la cepa resistente, pero poco es conocido aun sobre la influencia de los mecanismos de resistencia a imipenem sobre la virulencia y el *fitness* de *A. baumannii*.

Dentro de los factores de virulencia descritos, la formación de biofilm y la proteína OmpA son los que ofrecen datos más sólidos de relación con la resistencia a carbapenemas.

5.1. Producción de biofilm y resistencia a carbapenemas.

Las cepas de *A. baumannii* que se encuentra conformando un biofilm suelen presentar resistencia a antimicrobianos a los que son sensibles en su forma planctónica (200). Más allá de esta ventaja, existen algunos estudios en los que las cepas de *A. baumannii* productoras de biofilm, en su forma planctónica, presentaban un nivel más alto de resistencias que las no productoras (201)(202). La capacidad de formar biofilm de *A. baumannii* podría estar relacionada con la presencia y expresión de algunos mecanismos de resistencia antibiótica, como el gen *bla*_{PER-1}. El papel de éste es controvertido. Mientras que Lee *et al.* (158) encontraron una correlación positiva entre el nivel de expresión de este gen, la cantidad de biofilm formado sobre plástico y la adherencia a células epiteliales, en el estudio de Rao *et al.* (203) solo algunas de las cepas estudiadas que portaban *bla*_{PER-1} presentaron mayor cantidad de biofilm comparadas con cepas sin dicho gen.

Con respecto a la resistencia a imipenem en *Acinetobacter*, varios trabajos han intentado relacionarla con la formación de biofilm. Wroblewska *et al.* (204) concluyeron que no había relación entre la resistencia a carbapenemas y la capacidad de formar *biofilm*, si bien es cierto que su muestra era pequeña (de 34 cepas estudiadas, siete eran resistentes). En otro estudio llevado a cabo por Rao *et al.* (203) tampoco se halló relación entre la formación de *biofilm* (que se produjo en 34 de 55 cepas estudiadas) y la resistencia a imipenem (el 100% de las cepas eran resistentes), aunque sí se asoció a resistencias a otros antibióticos como amikacina, cefotaxima, ciprofloxacino y aztreonam. En cambio, en el trabajo realizado por Rodríguez-Baño *et al.* (205) las cepas formadoras de biofilm (63% de las estudiadas) fueron menos resistentes a imipenem que las no formadoras (25% vs. 47%, $p=0,04$). Dada esta disparidad de resultados, es necesario profundizar en el conocimiento de la relación entre la formación de biocapas y los distintos mecanismos de resistencia a imipenem en *A. baumannii*.

5.2. OmpA y resistencia a carbapenemas.

A. baumannii posee una membrana externa muy poco permeable, característica que se relaciona directamente con su resistencia intrínseca a muchos antimicrobianos. A tenor de los resultados del estudio de Sugararawa *et al.* (206), OmpA es una porina lenta y la principal responsable de difusión inespecífica a través de la membrana externa de *A. baumannii*. No obstante, este mecanismo no afecta a la sensibilidad a imipenem, como mostró el estudio de Smani *et al.* (207), en el que mutantes *knock-out* sin expresión de *ompA* presentaron un incremento de la CMI de ácido nalidíxico, aztreonam y cloranfenicol, pero no de imipenem, tetraciclina, tigeciclina, eritromicina, trimetoprim, kanamicina y ceftazidima. En *P. aeruginosa*, cuya OprF tiene un comportamiento parecido a la OmpA de *A. baumannii*, imipenem utiliza el canal OprD para difundir dentro de la célula (208). *A. baumannii* parece utilizar un mecanismo similar, en el que está implicado la proteína de membrana externa CarO, según se mencionó antes, y posiblemente también otros canales no tipificados hasta la fecha (206)(209).

En resumen, *A. baumannii* es un patógeno nosocomial que coloniza e infecta, fundamentalmente, a pacientes debilitados, con dispositivos invasivos y antibioterapia previa. La neumonía, especialmente la asociada a ventilación mecánica, y la bacteriemia, sobre todo la asociada a foco respiratorio, son las infecciones que ocasiona con mayor frecuencia este microorganismo. En un número importante de casos clínicos, se produce colonización sin llegar a desarrollar infección, no siendo conocida la relevancia clínica de la colonización respiratoria por *A. baumannii*. Existen resultados controvertidos en cuanto a la mortalidad atribuible de la neumonía asociada a ventilación mecánica por *A. baumannii* y de la relevancia en términos de mortalidad de las infecciones causadas por aislados resistentes a carbapenemas, que son mayoría en la actualidad. Aunque los factores que más se han asociado a desarrollo de infección clínica y a mortalidad en las infecciones por *A. baumannii* son aquellos relacionados con el huésped (situación basal debilitada y gravedad clínica), estudios recientes sugieren que diferencias en la virulencia de los aislados pueden explicar los dispares resultados en términos de mortalidad de las distintas series. No obstante, existen pocos datos disponibles sobre la relación entre factores de virulencia y resultados clínicos. En el entorno actual de predominio de cepas extremadamente resistentes con resistencia a carbapenemas, la relación entre los mecanismos de resistencia a imipenem y los factores de patogenicidad y virulencia de *A. baumannii*

necesita ser bien caracterizada. Por todo lo anterior, diseñamos este proyecto en el que nos proponemos conocer diversos aspectos relacionados con las cepas de *A. baumannii* que producen colonización frente a las que producen infección en vías respiratorias y la capacidad de producir bacteriemia entre las que producen infección, así como la virulencia, relacionándolo con los mecanismos de resistencia a imipenem que presenten las mismas.

II. HIPÓTESIS.

1. La supervivencia de los pacientes adultos con ventilación mecánica en las unidades de cuidados intensivos y con aislamiento de *A. baumannii* en muestras respiratorias es igual en pacientes con y sin signos de infección respiratoria.

2. Las cepas de *A. baumannii* colonizantes en vías aéreas tienen factores de virulencia diferentes a las cepas causantes de infección.

3. La adquisición de cepas con factores de virulencia distintos tiene impactos clínico y pronóstico diferentes en pacientes con ventilación mecánica ingresados en las UCI.

4. Las cepas de *A. baumannii* con distintos mecanismos de resistencia a imipenem presentan una virulencia diferente.

III. OBJETIVOS.

1. Evaluar la mortalidad asociada a la colonización de vías respiratorias por *A. baumannii* vs. la de las infecciones respiratorias por esta bacteria, con o sin bacteriemia, en los pacientes críticos con ventilación mecánica.
2. Comparar la presencia de determinados factores de virulencia entre las cepas clínicas colonizantes y productoras de infección: formación de *biofilm*, motilidad, expresión de *ompA*, adquisición de hierro y presencia de hemolisinas.
3. Evaluar la presencia de infección respiratoria, el desarrollo de bacteriemia y la mortalidad en los pacientes críticos con ventilación mecánica relacionados con la adquisición de cepas con distintos factores de virulencia bacteriana, anteriormente caracterizados.
4. Estudiar la asociación entre la presencia de mecanismos de resistencia a imipenem (baja expresión de porinas y presencia de carbapenemasas) y los factores de virulencia en la colección de cepas caracterizadas a partir del objetivo primero.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. OBJETIVO 1. Evaluar la mortalidad asociada a la colonización de vías respiratorias por *A. baumannii* vs. la de las infecciones respiratorias por esta bacteria, con o sin bacteriemia, en los pacientes críticos con ventilación mecánica.

4.1.1. Diseño.

Se ha realizado un estudio de cohortes, abierto, prospectivo, observacional y de base poblacional hospitalaria. Previamente al comienzo del estudio, se obtuvo la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

4.1.2. Ámbito y población de estudio.

La población de estudio incluye a todos los pacientes adultos ingresados en las unidades de cuidados intensivos (UCIs) del Hospital Universitario Virgen del Rocío que requirieran ventilación mecánica invasiva (VM) mediante intubación orotraqueal. Este hospital consta de 1,251 camas, incluyendo 62 camas en las UCIs de adultos que se distribuyen entre una unidad médico-quirúrgica general (incluye cirugía cardíaca y trasplantes de corazón, riñón e hígado) y una unidad de traumatología, neurocirugía y quemados. En estas UCIs se producen 3.600-3.800 ingresos al año (3.683 ingresos de media en los últimos 4 años).

4.1.3. Periodo de estudio.

El periodo de inclusión ha sido de 17 meses. Se ha reclutado para el estudio a todos los pacientes que cumplieran criterios de inclusión desde el 1 de Febrero de 2010 hasta el 30 de Junio de 2011.

4.1.4. Criterios de inclusión y exclusión.

4.1.4.1. Criterios de inclusión.

Eran candidatos a participar en el estudio todos los pacientes ingresados en UCI con edad igual o superior a 18 años, que precisaran VM durante al menos 48 horas. Se requería firma del consentimiento informado del estudio por parte de sus familiares.

4.1.4.2. Criterios de exclusión.

Se excluyeron aquellos pacientes con traqueostomía previa, fibrosis quística o ventilación mecánica crónica.

4.1.5. Definiciones.

4.1.5.1. Definición de caso.

Se incluyeron a los pacientes en la cohorte cuando presentaron al menos un aislamiento de *A. baumannii* en cultivo del aspirado traqueo-bronquial (ATB) durante el periodo de estudio, independientemente de la concentración del aislado en la muestra.

4.1.5.2. Definición de los diagnósticos de colonización de vías respiratorias y neumonía asociada a ventilación mecánica.

El diagnóstico inicial lo realizaron los médicos responsables de cada paciente. Posteriormente, el diagnóstico fue revisado por la doctorando y clasificado de forma definitiva en NAVM o colonización de vías respiratorias según los criterios CPIS (210) (Tabla 1): aquellos pacientes con una puntuación igual o superior a 6, con aislamiento de *A. baumannii* en ATB en el plazo de 72 horas antes o después de la fecha del diagnóstico, fueron clasificados como NAVM. Los que no cumplieron criterios de NAVM, fueron clasificados como colonización de vías respiratorias por *A. baumannii*.

Tabla 3. Criterios CPIS para el diagnóstico de NAVM.

Criterios	Puntuación
Temperatura	
36,1-38,4°C	0
38,5-38,9°C	1
≤36->38,9°C	2
Secreciones traqueales	
Ausencia	0
No purulentas	1
Purulentas	2
Oxigenación (pO ₂ /FiO ₂)	
>240	0
<240 sin SDRA	2
Leucocitos/ml	
4.000-11.000	0
<4.000 o >11.000	1
Formas en cayado >50%	2
Radiografía de tórax	
Sin infiltrados	0
Infiltrado difuso	1
Infiltrado localizado	2
Cultivo muestra respiratoria	
Positivo ≤10 ⁵ UFC/ml	0
Positivo ≥10 ⁶ UFC/ml	1
Misma bacteria que en tinción de Gram	2

4.1.6. Fuentes de información.

Se pueden diferenciar dos etapas en la recogida de información.

4.1.6.1. Identificación de casos.

Se realizó una búsqueda activa los días laborables de todas las semanas del periodo de estudio mediante entrevista diaria con los médicos responsables de las UCIs para identificar a los posibles candidatos. Tras la obtención del consentimiento informado, se procedía a recoger los datos basales y tomar una muestra de ATB para cultivo, y se iniciaba el seguimiento.

4.1.6.2. Recogida de información.

Se realizó a partir del análisis de la historia clínica de los pacientes mediante un formulario estandarizado. En caso de valores faltantes o dudosos, se procedía a entrevista con el médico responsable.

4.1.6.3. Seguimiento de los casos.

Los pacientes fueron seguidos hasta transcurridos 30 días desde la fecha de inclusión, o hasta la muerte o la extubación si se produjeron antes. El seguimiento incluía una extracción de ATB para cultivo cada 3 días y recogida de información. Si en alguna de estas muestras se aislaba *A. baumannii*, el paciente era definitivamente incluido en la cohorte. Todas las decisiones clínicas eran tomadas por los médicos responsables de los pacientes, incluida la extracción de otras muestras biológicas, como los hemocultivos, y la prescripción de tratamiento antibiótico.

4.1.7. Variables y protocolo de recogida de datos.

Se diseñó un formulario de recogida de datos que incluía las variables a continuación especificadas con sus correspondientes categorías y que fue cumplimentado por el equipo de trabajo a partir de las fuentes de información descritas.

4.1.7.1. Variables demográficas basales.

- Fecha de inclusión.
- Fecha de ingreso en UCI.
- Fecha de intubación.
- Edad (años).
- Sexo.

4.1.7.2. Variables clínicas.

a) Variables recogidas a su ingreso en el estudio:

- Diagnóstico que motiva su ingreso en UCI: estos diagnósticos se recogieron según la definición literal de los médicos responsables de cada paciente. Posteriormente fueron categorizados siguiendo la clasificación de Knauss (211).
- Gravedad clínica al ingreso en UCI: mediante el *score* APACHE II (212).
- Comorbilidades previas al ingreso en UCI: mediante el índice de Charlson (213).

b) Variables recogidas durante el seguimiento:

- Diagnóstico respecto al aislamiento de *A. baumannii*: diagnóstico de colonización de vías respiratorias o NAVM, según los criterios descritos, y fecha del mismo. En caso de que el paciente tuviera una bacteriemia por *A. baumannii* concomitante al diagnóstico de NAVM, se recogió este hecho, así como la fecha del mismo.
- Antibioterapia recibida, especificando fármacos, dosis, vía, fecha de inicio y fecha de finalización. En los pacientes con NAVM por *A. baumannii*, se clasificó la antibioterapia como apropiada o inapropiada en función de su actividad *in vitro* frente a los aislados de *A. baumannii*.
- Desarrollo de shock séptico de cualquier origen: se utilizaron los criterios estándar de shock séptico (214).
- Desarrollo de fracaso renal agudo de cualquier causa: se utilizaron los criterios AKIN (215).
- Resultados de los cultivos de ATB, especificando la fecha de toma de la muestra, el resultado, los microorganismos aislados en los cultivos positivos y la concentración de microorganismos expresada en \log_{10} UFC/ml.

c) Variables recogidas tras finalizar el seguimiento:

- Mortalidad: definida como muerte por cualquier causa en los primeros 30 días tras el primer aislamiento en ATB de *A. baumannii* en los pacientes colonizados y muerte en los primeros 30 días tras el diagnóstico de NAVM por *A. baumannii* en los pacientes con NAVM.
- Estancia en UCI: número de días transcurridos desde el primer aislamiento en ATB de *A. baumannii* hasta el día de alta de UCI. No se recogió en los pacientes que fallecieron durante el ingreso en UCI.

- Estancia hospitalaria: número de días transcurridos desde el primer aislamiento en ATB de *A. baumannii* hasta el día del alta hospitalaria. No se recogió en los pacientes que fallecieron durante el ingreso en el hospital.

4.2. OBJETIVOS 2 Y 3

OBJETIVO 2: Comparar la presencia de determinados factores de virulencia entre las cepas clínicas colonizantes y productoras de infección: formación de *biofilm*, motilidad, expresión de *ompA*, adquisición de hierro y presencia de hemolisinas.

OBJETIVO 3: Evaluar la presencia de infección respiratoria, el desarrollo de bacteriemia y la mortalidad en los pacientes críticos con ventilación mecánica relacionados con la adquisición de cepas con distintos factores de virulencia bacteriana, anteriormente caracterizados.

4.2.1. Procesamiento de las muestras y cultivos cuantitativos.

4.2.1.1. Procesamiento inicial de las muestras de ATB.

Todas las muestras de ATB se remitían de manera inmediata tras su toma al Laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Allí eran procesadas según el protocolo habitual, cuyo primer paso es tinción de Gram de frotis de la muestra y cuantificación del número de células epiteliales y de polimorfonucleares por campo para evaluar la calidad de la misma.

4.2.1.2. Cultivos cuantitativos.

Para el recuento bacteriano de las muestras obtenidas, se realizaron diluciones seriadas en PBS (Phosphate-buffered saline, Sigma-Aldrich Química S.L., Madrid) y posterior siembra en placas de agar-sangre (Francisco Soria Melguizo S.A., Madrid). En el caso en el que la consistencia de la muestra no fuera la adecuada para realizar las diluciones y siembras, éstas fueron diluidas con Sputasol (Oxoid S.A., Madrid) y la dilución realizada fue tomada en cuenta en el recuento final. La concentración bacteriana se expresó en logaritmo decimal de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (Log UFC/ml).

4.2.1.3. Procesamiento de los hemocultivos.

Todos fueron procesados mediante el sistema BACTEC NR860™ (Becton Dickinson, Cockeysville, Md.) en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital.

4.2.1.4. Identificación de los aislados.

La identificación de los aislados se realizó mediante alguna de siguientes técnicas: a) tests bioquímicos automatizados con el sistema multitest MicroScan Walkaway™ (Baxter HC, West Sacramento, California), b) MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight), utilizando un *biotyper* MALDI (Bruker Daltonics®).

4.2.1.5. Selección de aislados de *Acinetobacter baumannii*.

Se seleccionaron para los experimentos pertenecientes a este objetivo el primer aislado obtenido en una muestra de ATB en cada paciente. En aquellos pacientes que estuvieron colonizados antes de desarrollar una NAVM, se seleccionó para su análisis también el primer aislado concomitante con el diagnóstico de NAVM o inmediatamente posterior. Además, se analizaron también los aislados procedentes de hemocultivos.

De este grupo de aislados, se realizó una subselección para el estudio de la expresión de *ompA* especificada en el apartado 4.2.3.3.

4.2.2. Estudio de la relación clonal de las cepas.

Para analizar la relación clonal entre los aislados se utilizaron dos técnicas: REP-PCR y electroforesis en campo pulsado.

4.2.2.1. REP-PCR.

Se realizó por duplicado sobre cada uno de los aislados seleccionados según la técnica de Martín-Lozano *et al.* (216).

Se realizó siembra de cada uno de los aislados en una placa de agar Columbia (agar Columbia con sangre de carnero al 5%, Francisco Soria-Melguizo SA, Madrid, Ref. 770418), cultivándose durante 18 horas a 37°C para aislar colonias individuales. Tras la incubación, entre cuatro y cinco colonias de cada placa eran resuspendidas en 50 µl de agua destilada en tubos de microcentrífuga de 1 ml. Para producir la lisis celular y la obtención del ADN, estos tubos se calentaban a 95°C durante 10 minutos en termobloque (AccuBlock, Digital Dry Bath, Labnet International, Inc.) y, después, se enfriaban directamente en hielo. Tras este proceso, se centrifugaban durante 60 segundos a 6.000 revoluciones por minuto (rpm) en microcentrífuga (Centrifuge,

Thermo Scientific, Sorvall Legend Micro 21 R) con el objetivo de depositar los detritus celulares y separarlos de la suspensión de ADN. Estos extractos se guardaban en hielo para su uso inmediato en porciones de 10 µl, que eran incluidas en la mezcla para la realización de PCR sin ulterior purificación.

Se utilizaron los cebadores REP 1 (5'-IIIGCGCCGICATCAGGC-3') y REP 2 (5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3') (Invitrogen). Para la amplificación, se realizó una mezcla que incluía: 10 µl de extracto de ADN, 10 µl de triton al 0,1% (Triton, Sigma-Aldrich, Ref. X-100), 5 µl de tampón (10x PCR Rxn Buffer, P/N 402028, Invitrogen), 3 µl de MgCl₂ (MgCl₂ 50 mM P/N 402016, Invitrogen), 1 µl de dNTPs (dNTPs Mix 40mM, Promega Corporation, ref. U1515, Madison, EEUU), 1 µl de cebador REP-1, 1 µl de cebador REP-2, 0,4 µl de Taq-polimerasa (Taq DNA Polymerase, Cat#18038-042, Invitrogen) y agua destilada hasta completar 50 µl. En todas las tandas de PCR, se realizó un control negativo para detectar posibles contaminaciones de los reactivos a partir de una mezcla que contenía todos los componentes de la mezcla, a excepción del extracto de ADN, que era sustituido por 10 µl de agua destilada. La amplificación se realizó en termociclador (Thermal Cycler, Ref. 2720, Applied Biosystems) con el esquema: 10 minutos a 94°C, seguidos de treinta ciclos compuestos por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 45°C y 2 minutos a 72°C, y finalmente 16 minutos a 72°C.

Tras la amplificación, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% (1 g de agarosa D1 Low EEO, [Pronadisa; Cat#8014] y 100 ml de tampón 1x (Ultrapure 10x, TAE buffer, Invitrogen, Ref. 15558-026) conteniendo 10 µl de bromuro de etidio (10mg/ml) por cada 100 ml de gel (Promega Corporation, ref. H541, Madison, EEUU). Para ello, se depositó una alícuota de 15 µl de cada muestra, incluido el control negativo. El marcador molecular utilizado fue (Lamba Hind-III digested Cat#AM7720, Ambion). El resultado de la electroforesis de los geles fue fotografiado utilizando una cámara (Kodak, Image Station, 4000 mm).

4.2.2.2. Electroforesis en campo pulsado (PFGE).

Se realizó sobre cada uno de los aislados seleccionados según la técnica de Gautom *et al.* (217).

Se realizó siembra de cada uno de los aislados en placas de agar sangre y se incubaron durante 18 horas a 37°C en estufa (D-6450, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland). Los bloques para la realización de PFGE están compuestos por una mezcla de suspensión bacteriana, agarosa (8016, Pronadisa, Madrid) y proteinasa K (03115879001, Roche, Madrid). Se preparó una solución de agarosa al 1% con SDS (Sodium Dodecil Sulphate, L3771, Sigma-Aldrich, Madrid) al 1% pesando 0,2 g de

agarosa y resuspendiéndola en 19 ml de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 10 mM, pH 8), a lo que se le añadía 1 ml de SDS al 20%. Esta mezcla se calentaba hasta que quedara homogénea y se mantenía en un baño (Unitronic 320 OR, P-selecta, Barcelona) a 55°C hasta su utilización. La suspensión bacteriana se realizaba utilizando tubos de 10 ml con 2 ml de tampón de suspensión (Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH8). Se ajustaba el espectrofotómetro (Génesis 20, Thermo Spectronic, Barcelona) a 620 nm de longitud de onda y se realizaba una suspensión bacteriana de cada aislado hasta lograr una absorbancia de 0,85-0,9, correspondiente a la concentración objetivo de unas 10^9 células/ml. Posteriormente se transferían 500 µl de la suspensión bacteriana ajustada a un tubo de microcentrífuga (610-201, Greiner Bio-one, Carolina del Norte, EEUU) y se dejaban 10 minutos a 55°C. Tras este periodo de calentamiento, se le añadían 25 µl de proteinasa K a 20 mg/ml y 500 µl de la agarosa preparada. Los bloques se preparaban introduciendo la mezcla correspondiente a cada aislado en los pocillos de un peine Plug Mold (170-3706, BioRad, Alcobendas) y dejándolos solidificar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se prepararon tres bloques por cada aislado.

La segunda fase es la de lisis celular y lavados. Se preparaban tantos tubos falcon de 50 ml (210-261, Greiner Bio-one, Carolina del Norte, EEUU) como aislados a estudiar, y añadimos una solución compuesta por 5 ml de tampón de lisis (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8, sarcosil 1%) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml). En cada tubo se introducían los tres bloques de cada aislado preparados anteriormente, y se incubaban en un baño a 55°C en agitación vigorosa (100U/min) durante 2 horas con el nivel del agua por encima de la mezcla de los tubos. Pasadas las dos horas, se eliminaba la mezcla y se recuperaban los bloques, que se introducían nuevamente en su tubo Falcon correspondiente, añadiendo 10 ml de agua ultrapura precalentada a 55°C y se dejaban en el baño a 55°C con agitación suave durante 15 minutos. Este lavado con agua se repetía una segunda vez. Posteriormente, se eliminaba el agua conservando los bloques, y se añadían 10 ml de tampón TE, realizando otro ciclo de 15 minutos en el baño a 55°C con agitación suave, tras el cual se eliminaba el tampón TE conservando los bloques. Este lavado con tampón TE se repetía tres veces. Al finalizar la última, se añadían 5 ml de tampón TE a temperatura ambiente en los que se conservaban los bloques a 4°C hasta su utilización.

La tercera fase del proceso es la digestión del ADN. Para ello, se preparaba en primer lugar tampón de restricción 1x, diluyendo 20 µl del buffer A de la enzima 10x (ApaI, 10899208001, Roche, Madrid) en 180 µl de agua ultrapura (200 µl por aislado)

y seroalbúmina bovina BSA (100 µl/ml; B9000S, New England Biolabs, L'Hospitalet de Llobregat) utilizando 2 µl por aislado. Posteriormente, se cortaba la mitad de cada bloque y se añadía en un tubo de microcentrifuga con tampón 1x, incubándolo posteriormente a 25°C durante 15 minutos. Pasado este tiempo, se retiraba el tampón utilizado con pipeta y se añadía una mezcla de solución de restricción con endonucleasa Apal (10 U/µl, 10899208001, Roche, Madrid). Por cada aislado, la mezcla contenía: 175 µl de agua ultrapura, 20 µl de tampón 10x, 3 µl de Apal y 2 µl de BSA. El tubo con el bloque suspendido en esta mezcla era incubado durante 4 horas a 25°C con agitación suave.

En cuarto lugar, se realizaba la electroforesis. Para ello, se preparaba un gel de agarosa al 1% mezclando 2 g de agarosa para PFGE (161-3101, BioRad, Alcobendas) y TBE 0,5x (preparado previamente con 10 ml de TBE comercial (1 666 703, Roche, Madrid) 10x y 190 ml de agua destilada) y vertiendo la mezcla en un molde con 15 pocillos. Tras solidificar, en cada uno de ellos se introducía un bloque (previa estabilización de los mismos en 1 ml de TBE 0,5x a 4°C durante 15 minutos). La electroforesis se realizaba en un equipo CHEF-DR® II (BioRad, Alcobendas) con las siguientes condiciones: pulsos de 5-20 segundos, con un tiempo total de 19 horas, un voltaje de 6 V/cm y un ángulo de 120°. Una vez realizada la electroforesis, se pasaban los geles a un recipiente con bromuro de etidio (H5041, Promega, Alcobendas) (60 µl en 600 ml de agua destilada) para su tinción durante 30 minutos. Se realizó una fotografía del gel mediante el sistema (Gel Logic 200 Imaging System, Kodak, Madrid).

Para cada uno de los geles, se utilizó como referencia en el primer y último pocillo la cepa *A. baumannii* ATCC 19606. La lectura de las fotografías se realizó mediante el programa Fingerprinting 3.0 software (Bio-Rad, Hercules, CA). Los aislados se asignaron a los distintos grupos clonales siguiendo los criterios de Tenover *et al.* (218).

4.2.3. Determinación de factores de virulencia.

4.2.3.1. Formación de *biofilm*.

Para el estudio de la formación de *biofilm* se utilizó un experimento de expresión fenotípica *in vitro*.

En primer lugar, se realizaba siembra de cada uno de los aislados en placas de agar sangre y se incubaban durante 18 horas a 37°C en estufa. Posteriormente, se suspendían 4-5 colonias de cada placa en 10 ml de medio LB (Luria broth, Cat#1231.00, Pronadisa) y se incubaban nuevamente durante 18 horas a 37°C en

estufa. Transcurrido este tiempo, se realizaba una dilución 1:100 de cada uno de estos cultivos en medio LB. Posteriormente, se realizaba cultivo en placas de 96 pocillos con fondo en U, utilizando 4-5 pocillos para cada uno de los aislados y dejando 4-5 pocillos solo con medio de cultivo como control negativo. En cada pocillo se añadían 200 µl de la dilución realizada. En cada placa, se utilizaban como controles positivo y negativo una cepa productora y otra no productora de *biofilm*. Las placas se incubaban durante 24 horas a 37°C.

Tras este periodo, se descartaba el sobrenadante y, tras varios lavados con agua estéril por inmersión, se realizaba tinción del *biofilm* mediante adición de 200 µl de cristal violeta al 0,4% (Ref. HT90132, Sigma-Aldrich) a cada pocillo e incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se lavaba nuevamente con agua destilada y se realizaba dilución del *biofilm* teñido mediante adición de 200 µl de etanol al 95%, manteniéndolo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla era entonces homogeneizada con pipeta multicanal y el volumen resultante transferido a una placa de 96 pocillos con fondo plano para su lectura.

La lectura se realizaba mediante espectrofotometría, (Biochrom Asys UVM340) con longitud de onda 580 nm. El valor utilizado era el correspondiente a la media del valor obtenido por todos los pocillos correspondientes al mismo aislado. Aquellas cepas que presentaron una producción de *biofilm* dos o más veces superior a su control positivo fueron clasificadas como hiperproductoras de *biofilm*.

4.2.3.2. Motilidad en superficie.

La determinación de la motilidad se realizará mediante estudio fenotípico según el método descrito por Clemmer *et al.* (172).

En primer lugar, se realizó cultivo en placas de agar sangre de cada uno de los aislados, de una cepa control positivo (*A. baumannii* ATCC 19606) y una cepa control negativo (*A. baumannii* GEIH 8, de la colección de aislados clínicos propia AbGEIH2010) mediante la siembra e incubación durante 18 horas a 37°C.

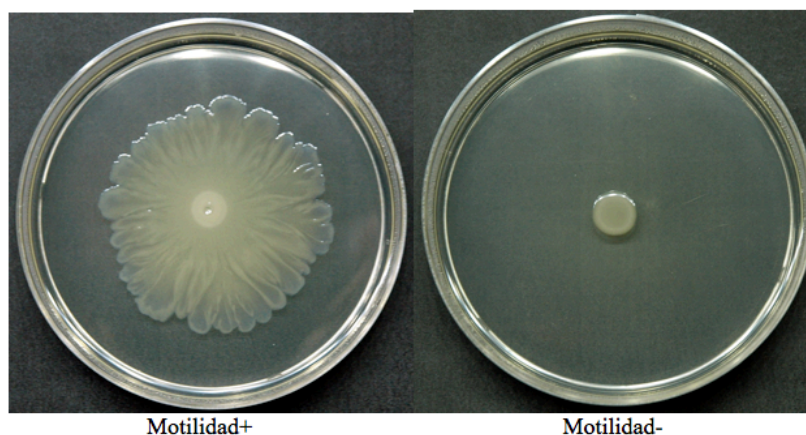
Posteriormente, se preparaba el medio de cultivo específico LB con agarosa al 0,3%. Para un litro de medio se utilizaba: 1 litro de agua destilada, 20 g de LB y 3 g de agarosa. Esta mezcla se autoclavaba y se mantenía en estufa a 60°C hasta su utilización. Para hacer las placas, se vertían 25 ml de medio en placas de Petri de 15 cm en campana de flujo laminar y se dejaban secar a temperatura ambiente durante una hora.

La siembra se realizaba tomando una pequeña cantidad de una colonia crecida en las placas de agar sangre con una punta de pipeta y tocando con ella el centro de

una placa con LB-agarosa. Las placas se incubaban con la tapadera hacia arriba en ambiente saturado de humedad a 37°C durante 24 horas. Se realizó cultivo de cada aislado por triplicado.

La lectura se realizó mediante comparación visual con estándares positivo y negativo (figura 2).

Figura 2. Placas utilizadas como estándar positivo y negativo, respectivamente, para el estudio de la motilidad bacteriana.



4.2.3.3. Expresión de *OmpA*.

Se analizó la expresión del gen *ompA* en una selección de aislados, eligiéndose varios representantes de cada clon obtenido en función de criterios clínicos para incluir aislados colonizantes, productores de NAVM no bacteriémica y productores de NAVM bacteriémica. Se realizó por triplicado para cada cepa mediante RT-PCR en tiempo real.

En primer lugar, se realizó cultivo en 20 ml de LB a 37°C durante 18 horas con agitación a 180 rpm de cada uno de los aislados seleccionados y de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, que se utilizaba como cepa control para calibrar la expresión normalizada de *ompA*. 400 µl de este cultivo se resuspendían en 20 ml de LB y se incuban durante 4 horas a 37°C con agitación a 180 rpm para alcanzar fase de crecimiento exponencial ($OD_{600} = 0,6$). A partir de estos cultivos, se aisló el RNA bacteriano usando el kit comercial TRIzol® Max™ Bacterial Insolation Kit; (Invitrogen, España). Para ello, se transferían 1,5 ml de estos cultivos a tubos de microcentrífuga y se centrifugaban a 6.000 *g* durante 5 minutos a 4°C en microcentrífuga. Tras la centrifugación, se descartaba el sobrenadante y se resuspendía el *pellet* bacteriano en 200 µl de *Max Bacterial Enhancement Reagent* precalentado a 95°C, y se incubaba durante 4 minutos a 95°C en termobloque para provocar la lisis celular. Posteriormente

se mezclaba con 1 ml de *TRIzol Reagent* y se incubaba a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras esta fase, se añadían 0,2 ml de cloroformo frío y se incubaba la mezcla durante 2-3 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugarlas a 12.000 *g* durante 15 minutos a 4°C. Tras esta centrifugación, la mezcla queda separada en tres fases: una inferior roja correspondiente a fenol-cloroformo, una intermedia y una superior de aspecto acuoso que es la que contiene el ARN y contiene unos 400 μ l. Para precipitar el ARN, se extraía esta fase acuosa y se transfería a un tubo nuevo, mezclándolo con 0,5 ml de isopropanol frío e incubando a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras esta incubación se centrifugaba a 15.000 *g* durante 10 minutos a 4°C. Tras esta centrifugación se quedaba un *pellet* tipo gel formado en los laterales y el fondo del tubo. Se retiraba el sobrenadante cuidadosamente y se resuspende el *pellet* en 1 ml de etanol al 75%, centrifugándolo a 7.500*xg* durante 5 minutos a 4°C. Se descartaba el sobrenadante y se secaba al aire. Este *pellet* se resuspendía en 50 μ l en agua libre de ARNasa y se incubaba durante 10 minutos a 60°C. Después, se incubaba el ARN con DNAasa y su *buffer* (5 μ l del 10x DNAasa *buffer* y 2 μ l de DNAasa (4-6 U) a 37°C durante 1 hora. A esta mezcla se añaden 5 μ l de inactivador de DNAasa, se incuban durante 5 min a temperatura ambiente, y se centrifugan a 10.000*xg* durante 2 minutos para luego guardar el sobrenadante que contiene el ARN a -80°C.

Para determinar la cantidad de ARN purificado, se transfiere 1 μ l de la muestra en el Nano Drop (Nano pro 2000) y se mide la absorbancia de la muestra a 260 nm.

Una vez extraído y cuantificado, el RNA se convertía en cADN mediante el kit comercial *QuantiTect Reverse Transcription* (Qiagen, España) según las normas del fabricante. Todo el procedimiento se realizaba en hielo en un área libre de ARN. En primer lugar, se realizaba una mezcla con 2 μ l de *gDNA Wipeout Buffer 7x*, un volumen ajustado de la mezcla que contuviera 1 μ g de ARN y agua purificada libre de ARN hasta completa 14 μ l. Esta mezcla era incubada durante 2 minutos a 42°C y después enfriada inmediatamente en hielo. A continuación, se mezclaban 1 μ l de *Quantiscript Reverse Transcriptase*, 4 μ l de *Quantiscript RT Buffer 5x* y 1 μ l de *RT Primer Mix* por cada muestra de ARN que se fuera a analizar. Seis μ l de esta mezcla se añadían a los 14 μ l de la anterior y se incubaba a 42°C durante 30 minutos y, posteriormente, a 95°C durante 3 minutos (para inactivar la transcriptasa inversa). Una vez finalizado este proceso, se procedía a la realización de la RT-PCR.

La RT-PCR en tiempo real se realizó mediante el sistema MX3005P (Stratagene, La Jolla, CA) usando los cebadores específicos descritos en la tabla 4. En

primer lugar, se realizaba una mezcla con 5 µl de cDNA diluido 1:5, 4 µl de H₂O libre de RNAasa, 10 µl Sensifast low Rox 2x, 1 µl de primers específicos (Tabla X). El perfil térmico de la PCR empleado en la detección del gen de *ompA* y ribosomal se resume en la tabla 5.

Se analizaron conjuntamente controles negativos sin transcriptasa inversa para asegurar la ausencia de DNA contaminante en las muestras. La expresión de mRNA para el gen *ompA* se normalizaba tomando como referencia el del gen constitutivo de la unidad 23S ribosómica.

La expresión normalizada de *ompA* de cada cepa se calibró en función de la expresión en la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 con el método de $\Delta\Delta C_T$ (Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-delta delta C(T))} method. *Methods* 2001 ; 25 : 402-8.) y usando la formula de $2^{-\Delta\Delta C_T} = \Delta C_T = C_{T(ATCC\ 17978)} - C_{T(cepa\ de\ estudio)}$.

$\Delta C_{T(ATCC\ 17978)} = C_T(\text{gene } ompA \text{ de cepa ATCC 17978}) - C_T(\text{gene de referencia de cepa ATCC 17978})$.

$\Delta C_{T(cepa\ de\ estudio)} = C_T(\text{gene } ompA \text{ de cepa de estudio}) - C_T(\text{gene de referencia de cepa estudio})$.

Tabla 4. Secuencias de los cebadores a utilizar en el estudio de expresión de *ompA*.

Primers	Secuencias (5'-3')
RiboFor	GTAGCGGTGAAATGCGTAGA
RiboRev	CTTCGTACCTCAGCGTCAG
riboProbe	[DFAM]CGAAGGCAGCCATCTGGCCT[DTAM]
ompAFor	AGCTCTTGCTGGCTTAAACG
ompARev	GAGCAACTGGAGTTGGTTCA
ompAProbe	[DFAM]CAGCAGGCTTCAAGTGACCACCA[DTAM]

Tabla 5. Perfil térmico de la PCR empleado en la detección del gen *ompA* y ribosomal.

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	95°C	10 min
2	95°C	30 seg
3	60°C	1 min
4	72°C	30 seg
5	40 ciclos desde paso 2	

4.2.3.4. CAPACIDAD DE ADQUISICIÓN DE HIERRO.

Se realizó inicialmente microdifusión en caldo (medio MHB) según los estándares del *Clinical*

4.2.3.4. Capacidad de adquisición de hierro.

Se realizó inicialmente microdilución en caldo (medio MHB) según los estándares del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) (219). Para ello se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos, conteniendo 50 µl de MHBCA (Fluka, Ref. 90922, Sigma-Aldrich) a los que se añadieron 2,2'-dipiridil (DIP) (Fluka, Ref. 36759, Sigma-Aldrich), quelante de hierro sintético, para estudiar el crecimiento de las cepas en medio con concentraciones diferentes de hierro. A continuación se añadieron 50 µl de cada uno de los antimicrobianos a la primera columna de pocillos de la placa. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1:2 a partir de la primera columna de pocillos. De esta forma se precisaron un total de 10 pocillos que contenían concentraciones de antimicrobiano decrecientes con el rango de concentraciones 256-0,5 mg/l. Finalmente, se añadieron 50 µl (concentración final de 5×10^5 UFC/ml) de cada una de las cepas seleccionadas de *A. baumannii* a las placas, obtenidas a partir de un cultivo de 4 horas (fase de crecimiento logarítmico) en medio líquido MHB (Mueller-Hinton Broth, Ref. CM0405, Oxoid, Hampshire, England) en aerobiosis a 37°C y sin atmósfera de CO₂.

Se realizaron, además, controles de crecimiento con inóculo bacteriano y sin antibiótico y control de esterilidad sin antibiótico y sin inóculo.

Se planteó inicialmente que, en caso de existir 3 o más diluciones de diferencia entre aislados, se realizaría un estudio de expresión de acinetobactina en cepas seleccionadas, eligiéndose representantes de cada clon con diferentes CMI's a DIP. Para ello, se utilizaría un análisis mediante RT-PCR basada en la técnica descrita por Dorsey et al (176). No obstante, ante la ausencia de diferencias entre los distintos aislados (según se especifica en el apartado correspondiente), se decidió no realizar dicho estudio de expresión.

4.2.3.5. Producción de hemolisinas.

La presencia de hemolisinas con actividad hemolítica en sangre humana se caracterizó por duplicado en todas las cepas seleccionadas mediante ensayo fenotípico en placas con agar Columbia complementada con sangre humana desfibrinada al 5%.

En primer lugar, se realizaba el medio de cultivo. Para ello, se extraían 50 ml de sangre a un voluntario sano mediante técnica de venopunción aséptica y succión con jeringa. Con el objetivo de desfibrinarla, la sangre se colocaba inmediatamente en un matraz aforado con una bola de vidrio por cada mililitro extraído y se ponía en

agitación durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se recogía la sangre con una pipeta, dejando las bolas de vidrio y el coágulo de fibrina formado en el matraz, y se mezclaba en proporción 1:1 con PBS 1x estéril. Esta mezcla se repartía en varios tubos falcon y se centrifugaba a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se retiraba la misma cantidad de PBS que se hubiera añadido, se resuspendía el pellet de células sanguíneas y se volvía a centrifugar con los mismos parámetros. Este procedimiento se repetía 5 veces. Finalmente, se añadía la misma cantidad de PBS estéril que en los pasos previos y se mantenía a 4°C hasta su utilización. Para la elaboración de medio agar Columbia con un 5% de sangre humana se utilizó agar Columbia (Sigma, Cat#27688). Se elaboró el medio según recomendación del fabricante, suspendiendo 42 g por cada litro de agua destilada y autoclavando a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, se mezcló con la sangre extraída para conseguir mezcla al 5% (50 ml de sangre por cada 950 ml de medio autoclavado) y se vertió en placas de Petri en campana de flujo laminar (12 ml por placa), dejando solidificar a temperatura ambiente.

Los aislados seleccionados para su estudio eran sembrados en placas de agar sangre comerciales e incubados durante 18 horas a 37°C. Posteriormente, se procedía a su siembra en las placas con medio fabricado mediante toma de material de una colonia con una punta de pipeta y punción con la misma en el medio, introduciéndola unos 2 mm. En todas las placas, se utilizó como control positivo una cepa de *A. haemolyticus* (cepa GEIH6, de la colección de cepas propia AbGEIH2010). Una vez sembradas, las placas eran incubadas durante 48 horas en estufa a 37°C. Tras este periodo, se realizaba la lectura, considerando positivas para actividad hemolítica aquellas cepas que tuvieran un halo de hemólisis beta alrededor de la colonia.

4.3. OBJETIVO 4: Estudiar la asociación entre la presencia de mecanismos de resistencia a imipenem (baja expresión de porinas y presencia de carbapenemasas) y los factores de virulencia en la colección de cepas caracterizadas a partir del objetivo primero.

Para este objetivo, se utilizaron los mismos aislados seleccionados en el apartado 4.2.1.5.

4.3.1. Estudio de sensibilidad a antimicrobianos.

4.3.1.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de amikacina, ceftazidima, ciprofloxacino, colistina, imipenem, rifampicina, sulbactam y tigeciclina.

El estudio de la CMI se llevó a cabo por duplicado para cada aislado mediante el método de microdilución en caldo. Para ello se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos, conteniendo 50 µl de MHBCA a los que se añadieron los antimicrobianos: amikacina, ceftazidima, ciprofloxacino, colistina, imipenem, rifampicina, sulbactam y tigeciclina (tabla 6). Para la determinación de la CMI de ciprofloxacino se añadió al medio 1 ml de NaOH 1 M por cada 50 ml de MHBCA. Para la determinación de la CMI de rifampicina se añadió al medio 0,25 ml de metanol (Metanol, Ref. ME03062500, Scharlav) por cada ml de MHBCA.

Tabla 6. Antimicrobianos utilizados para el estudio de sensibilidad.

Antibiótico	Marca comercial
Amikacina	Amikacin sulfate salt, Ref. A2324-5g, Sigma-Aldrich
Ceftazidima	Ceftazidime hydrate, Ref. C3809-1g, Sigma-Aldrich
Ciprofloxacino	Ref. 17850-5g, Sigma-Aldrich
Colistina	Ref. C4461, Sigma-Aldrich
Imipenem	Ref. I0160-25 mg, Sigma-Aldrich
Rifampicina	Ref. R-3501, Sigma-Aldrich
Sulbactam	Sulbactam. Ref. S9701, Sigma-Aldrich
Tigeciclina	Tigeciclina, Ref. SRP02356T, Sequoia Research

A continuación se añadieron 50 µl de cada uno de los antimicrobianos a la primera columna de pocillos de la placa. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1:2 a partir de la primera columna de pocillos. De esta forma se precisaron un total de 10 pocillos que contenían concentraciones de antimicrobiano decrecientes con los rangos de concentraciones que muestra la Tabla 2.

Para la preparación de los antimicrobianos se utilizaron sustancias valoradas suministradas por cada una de las casas comerciales, y fueron preparadas siguiendo las normas del CLSI (219).

Finalmente, se añadieron 50 µl (concentración final de 5×10^5 UFC/ml) de cada una de las cepas seleccionadas de *A. baumannii* a las placas, obtenidas a partir de un cultivo de 4 horas (fase de crecimiento logarítmico) en medio líquido MHB en aerobiosis a 37°C y sin atmósfera de CO₂.

Se realizaron, además, controles de crecimiento con inóculo bacteriano y sin antibiótico y control de esterilidad sin antibiótico y sin inóculo. Las cepas control utilizadas para cada antibiótico aparecen especificadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Rango de concentraciones y cepas control utilizados para la determinación de CMI de cada antimicrobiano.

Antibiótico	Rango de concentraciones	Cepa control
Amikacina	256-0,5 mg/l	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Ceftazidima	256-0,5 mg/l	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Ciprofloxacino	256-0,5 mg/l	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Colistina	32-0,06 mg/l	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Imipenem	256-0,5 mg/l	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Rifampicina	512-1 mg/l	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Sulbactam	256-0,5 mg/l	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Tigeciclina	32-0,06 mg/l	<i>E. coli</i> ATCC 25922

Todas las placas se incubaron en aerobiosis a 37°C y sin atmósfera de CO₂ durante 24 horas. Tras ese período se realizó la lectura de los mismos, definiendo como CMI la concentración más baja de antimicrobiano a la cual el caldo no presentaba turbidez macroscópica visible.

Para la definición de sensibilidad y resistencia se utilizaron los criterios definidos por CLSI M100-S20 (219) para imipenem, sulbactam, ceftazidima, ciprofloxacino, amikacina y colistina. La susceptibilidad a tigeciclina se clasificó según criterios de EUCAST en sensible con CMI ≤ 1 mg/l y resistente con CMI ≥ 4 mg/l (220). La susceptibilidad a rifampicina se clasificó según criterios de la Sociedad Francesa de Microbiología en sensible con CMI ≤ 4 mg/l y resistente con CMI ≥ 32 mg/l (221).

4.3.1.2. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) de amikacina, ceftazidima, ciprofloxacino, colistina, imipenem, rifampicina, sulbactam y tigeciclina.

El cálculo de la CMB se realizó mediante la siembra en placas de agar sangre de 100 μ l del último pocillo con crecimiento visible en el estudio de CMI y de todos aquellos que no presentaron turbidez, incubándose posteriormente en aerobiosis a 37°C y sin atmósfera de CO₂ durante 18-24 horas. Se consideró como CMB la concentración más baja de antibiótico capaz de reducir el inóculo inicial en un 99,9% (222). Es decir, la CMB fue la menor concentración de antimicrobiano responsable de una reducción de 3 Log₁₀ UFC/ml respecto al inóculo inicial.

4.3.1.3. Determinación de la CMI de meropenem y detección fenotípica de metalobetalactamsas (MBL).

La CMI de meropenem se realizó mediante Etest. Para ello, se suspendieron 4-5 colonias de cada aislado en estudio en 2 ml de suero salino fisiológico al 0,9%, recogidas de un cultivo en placa mediante asa de siembra y homogeneizando posteriormente con ayuda de un vórtex.

A continuación, se transfirió 1 ml de la suspensión a una cubeta de espectrofotometría y se calculó la concentración bacteriana mediante espectrofotómetro (Eppendorf Bio Photometer, BioRad) con una longitud de onda de 580 nm.

Una vez conocida la densidad óptica de la suspensión correspondiente a cada aislado, se ajustó la dilución para conseguir una densidad óptica de 0,6, añadiendo la cantidad de SSF 0,9% necesario para alcanzarla. Esta cantidad se calculó mediante la fórmula $C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$.

Se sembraron en placas de MH-agar (Mueller-Hinton Agar 150 mm, Ref. 770495, Francisco Soria Melguizo SA, Madrid) 100 µl de cada suspensión, realizando una siembra lo más homogénea posible, sobre las que se colocaron tiras de Etest MBL (MP/MPI), (Etest MP/MPI, Ref. 411362, Biomerieux SA). Todas las placas se incubaron en aerobiosis a 37°C y sin atmósfera de CO₂ durante 24 horas. Tras ese período se realizó la lectura de los mismos, considerando como la CMI a meropenem el punto en el que el halo de inhibición contacta con la tira de Etest. Se consideró que el aislado era sensible a meropenem cuando la CMI era <8 mg/l. Además, se valoró como test positivo para presencia de MBL cuando la ratio entre la CMI de meropenem y la de meropenem+EDTA era ≥8, ante la presencia de una “zona fantasma” o deformidad en las elipses (223).

4.3.2. Determinación de mecanismos de resistencia a carbapenemas.

4.3.2.1. Selección de aislados.

El punto de corte de CMI de imipenem establecido para realizar determinación de mecanismos de resistencia a carbapenemas era 8 mg/L, por lo que todos los aislados fueron seleccionados.

4.3.2.2. Determinación de oxacilinasas.

Se estudió la presencia de las oxacilinasas *bla*OXA-23, *bla*OXA-40, *bla*OXA-51 y *bla*OXA-58 mediante PCR multiplex según la técnica descrita por Woodford *et al.*

(224).

Se realizó extracción de ADN mediante calor, según la técnica descrita en el apartado 4.2.2.1.

Los cebadores utilizados son los enumerados en la tabla 8. Para la amplificación, se realizó una mezcla que incluía: 10 µl de extracto de ADN, 10 µl de triton al 0,1%, 5 µl de *buffer*, 3 µl de MgCl₂, 1 µl de dNTPs, 1 µl de la suspensión de cada uno de los cebadores, 0,4 µl de Taq-pol y agua destilada hasta completar 50 µl. En todas las tandas de PCR, se realizó un control negativo para detectar posibles contaminaciones de los reactivos a partir de una mezcla que contenía todos los componentes de la mezcla, a excepción del extracto de ADN, que era sustituido por 10 µl de agua destilada. Se realizó amplificación en termociclador. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 25 segundos a 94°C, 40 segundos a 52°C y 50 segundos a 72°C, y un periodo de elongación final a 72°C durante 6 minutos.

Tras la amplificación, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo la misma técnica explicada en el apartado 4.2.2.1. El resultado de la electroforesis de los geles fue fotografiado utilizando una cámara Kodak Image Station 4000 mm.

Tabla 8. Secuencias de los cebadores a utilizar en la caracterización de carbapenemasas tipo OXA.

Cebadores	Secuencias (5'-3')
OXA-51-likeF	TAATGCTTTGATCGGCCTTG
OXA-51-likeR	TGGATTGCACTTCATCTTGG
OXA-23-likeF	GATCGGATTGGAGAACCAGA
OXA-23-likeR	ATTTCTGACCGCATTTCCAT
OXA-24-likeF	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA
OXA-24-likeR	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT
OXA-58-likeF	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG
OXA-58-likeR	CCCCTCTGCGCTCTACATAC

La expresión de *bla*OXA-51 se estudió de forma indirecta valorando la presencia de la secuencia *ISAb₁* en el promotor del gen de OXA-51. Esto se realizó mediante PCR, basándonos en la técnica y los hallazgos descritos por Ruiz *et al.* (225). Los cebadores a utilizar son los expuestos en la tabla 9. Tras la amplificación,

se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% (D1 Low EEO).

Tabla 9. Secuencias de los cebadores a utilizar en el estudio de la presencia de la secuencia *ISAbal* asociada al gen de OXA-51.

Cebadores	Secuencias (5'-3')
ISAbalF	CATTGGCATTAACTGAGGA
OXA-51-likeR	TGGATTGCACTTCATCTTGG

4.3.2.3. Determinación de metalobetalactamasas.

Se estudió la presencia de las MBL IMP y VIM mediante PCR multiplex según la técnica descrita por Ellington *et al.* (226)

Se realizó extracción de ADN mediante calor, según la técnica descrita en el apartado 4.2.2.1.

Los cebadores utilizados son los enumerados en la tabla 10. Para la amplificación, se realizó una mezcla que incluía: 10 µl de extracto de ADN, 10 µl de triton al 0,1%, 5 µl de *buffer*, 3 µl de MgCl₂, 1 µl de dNTPs, 1 µl de la suspensión de cada uno de los cebadores, 0,4 µl de Taq-pol y agua destilada hasta completar 50 µl. En todas las tandas de PCR, se realizó un control negativo para detectar posibles contaminaciones de los reactivos a partir de una mezcla que contenía todos los componentes de la mezcla, a excepción del extracto de ADN, que era sustituido por 10 µl de agua destilada. Se realizó amplificación en termociclador. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 36 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 52°C y 50 segundos a 72°C, y un periodo de elongación final a 72°C durante 5 minutos.

Tras la amplificación, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo la misma técnica explicada en el apartado 4.2.2.1. El resultado de la electroforesis de los geles fue fotografiado utilizando una cámara Kodak Image Station 4000 mm.

Tabla 10. Secuencias de los cebadores a utilizar en la caracterización de MBL.

Cebadores	Secuencias (5'-3')
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC
IMP-R	CCAAACYACTASGTTATCT
VIM-F	GATGGTGTTTGGTCGCATA
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG

4.3.2.4. Expresión de porinas.

Se analizaron las proteínas de membrana externa por duplicado sobre todos los aislados seleccionados, tras comprobar CMI a imipenem ≥ 8 mg/l. Las proteínas de la membrana externa se extrajeron por sonicación y se evaluaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% según el método descrito por Fernández Cuenca *et al.* (227).

En primer lugar, se tomaban 3-4 colonias de cada aislado previamente cultivados en placas de agar sangre y se incubaban durante 18 horas a 37°C en 10 ml de MHB. Estos 10 ml se resuspendían en 40 ml de MHB, que eran incubados durante 4 horas a 37°C en agitación, con el objetivo de conseguir que la cepa alcanzase la fase exponencial de crecimiento. Mientras tanto, se preparaba 1 litro de tampón fosfato sódico (10 mM, pH 7,2) con la mezcla de 6,84 ml de Na_2HPO_4 (1 M), 3,16 ml NaH_2PO_4 (1 M) y 990 ml de agua destilada.

Finalizada la incubación de 4 horas, los cultivos se centrifugaban a 5.000xg durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente se retiraba el sobrenadante, se resuspendía el *pellet* bacteriano en 20 ml de tampón fosfato sódico y se volvía a centrifugar a 5.000xg durante 10 minutos a 4°C. Tras la segunda centrifugación, se retiraba el sobrenadante y se resuspendía el *pellet* en 5 ml de tampón fosfato. Esta suspensión era la utilizada para la lisis celular por sonicación. Esta se realizaba por sonicación en hielo (Vibra Cell 75115, Bioblock Scientific, Illkirch, Francia), realizando siete ciclos de 30 segundos, con amplitud al 21%. Tras la sonicación, se centrifugaba en los tubos a 5.000xg durante 5 minutos a 4°C. Desechando el *pellet* de bacterias no lisadas, se repartía el sobrenadante, que contenía las bacterias lisadas, en tubos de microcentrífuga y estos se centrifugaban a 13.000xg durante 45 minutos a 4°C. El *pellet* resultante, formado por membranas bacterianas externas e internas, era conservado a -20°C hasta su utilización.

El siguiente paso era la purificación del extracto de proteínas de membrana. Para ello, se descongelaban a temperatura ambiente los tubos que contenía los *pellet* y se resuspendían estos en 500 μl de N-Lauril-Sarcosinato sódico al 2% (Ref. L5125, Sigma-Aldrich), incubándolos a temperatura ambiente durante 30 minutos para romper la membrana interna y permitir la solubilización de las proteínas de membrana. Pasado este periodo, esta solución era centrifugada a 13.000xg durante 45 minutos a 4°C. Se retiraba posteriormente el sobrenadante y se añadía 1 ml de Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8) en cada tubo, resuspendiendo con pipeta. Esta mezcla volvía a centrifugarse a 13.000xg durante 45 minutos a 4°C. El sobrenadante era completamente retirado con

ayuda de micropipeta y se añadía 15 μ l de Tris-HCl en cada tubo, mezclando bien y transfiriendo todo el contenido a un mismo tubo de microcentrífuga. Estos tubos eran conservados a 4°C o utilizados inmediatamente.

A continuación se preparaban los geles de poliacrilamida que se iba a utilizar para realizar la electroforesis de las proteínas de membrana externa. En primer lugar, se preparaba el gel de migración o *Resolving gel* con un 10% de acrilamida, mezclando los siguientes componentes por cada gel: 2 ml de agua destilada, 1,25 ml de 1,5M Tris-HCL (pH8,8), 50 μ l de 10% APS y 2,5 μ l de TEMED. Esta mezcla se vertía en la cubeta y se aplanaba con agua. Mientras tanto, se hacía la mezcla del gel de concentración o *Stacking gel*, que contenía por cada gel: 1,35 ml de agua destilada, 250 μ l de 1M Tris-HCl pH 6,8, 20 μ l de 10% SDS, 325 μ l de 30% Bis/Acrilamida, 20 μ l de 10% APS y 2 μ l de TEMED. Esta mezcla se vertía en la cubeta sobre el *Resolving gel*, se colocaba encima el peine y se dejaba solidificar a temperatura ambiente.

La concentración de proteínas se medía mediante Bradford con el objetivo de obtener una concentración final para el gel de 4 μ g de proteína. Para ello, se mezclaban 400 μ l de agua, 100 μ l de Bradford y 5 μ l de extracto de proteínas en una cubeta de espectrofotometría. Se realizaba la medición con el espectrofotómetro (Eppendorf Bio Photometer, BioRad) en modo Bradford Micro, que daba un valor en μ g/ml. A partir de este valor, y teniendo en cuenta que procedía de una dilución 1:100 de la muestra, se calculaba la concentración de proteínas en el extracto y la cantidad de este que hacía falta para conseguir 4 μ g de proteína. Esta cantidad calculada se mezclaba con 5 μ l de tampón de carga 6x y con agua destilada hasta conseguir un volumen final de 30 μ l. Esta cantidad se incubaba a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se introducía en un pocillo del gel. El primero de los pocillos se utilizaba para colocar 10 μ l de marcador de peso. Este gel se corría a 100 V durante 3-4 horas (el tiempo necesario para que se completara la electroforesis a lo largo de todo el gel. Una vez corrido el gel, se realizaba una tinción con Coomassie (SimplyBlue™ SafeStain, Ref. LC6060, Invitrogen). Para ello, se colocaba el gel en una cubeta con 100 ml de agua ultrapura y se calentaba en microondas durante 45 segundos. Posteriormente, se agitaba durante 2 minutos en el agitador orbital. El agua se desechaba y se añadían otros 100 ml de agua ultrapura, repitiendo el procedimiento anterior en tres ocasiones. A continuación, tras desechar el agua, se añadían 30 ml de SimplyBlue™ SafeStain y se calentaba en microondas durante 45 segundos. Se agitaba en agitador orbital durante 10 minutos y se desechaba el líquido.

Posteriormente, se realizaban tantos lavados con 100 ml de agua, según el procedimiento previo, como fuera preciso para que esta quedara completamente limpia tras el lavado. Finalmente, se realizaba una fotografía del gel mediante transiluminación en la cámara Kodak Image Station 4000 mm.

4.4. Análisis estadístico.

4.4.1. Variables.

Las variables resultado seleccionadas fueron la mortalidad, la estancia en UCI y la estancia hospitalaria, según las definiciones del apartado 4.1.7.2. Las variables independientes consideradas fueron todas las demás variables demográficas y clínicas, según lo descrito en el mismo apartado, siendo especialmente relevante la variable referente al tipo de infección por *A. baumannii* (NAVM +/- bacteriemia) o colonización respiratoria y los datos obtenidos a partir de la determinación de mecanismos de virulencia, estudio de sensibilidad y mecanismos de resistencia a imipenem de las cepas estudiadas.

4.4.2. Análisis descriptivo.

Las variables cualitativas están expresadas como frecuencias absolutas y porcentajes. En las variables cuantitativas se utilizaron como medidas de tendencia central y dispersión la media \pm desviación estándar o la mediana y el rango intercuartílico (IQR) según se considerara apropiado. Los cálculos sobre estancias hospitalaria o en UCI se realizaron solamente sobre aquellos pacientes que sobrevivieron hasta el alta hospitalaria o de la UCI, respectivamente. Estas variables no presentaban una distribución normal, por lo que se realizó una transformación logarítmica para su análisis.

4.4.3. Análisis bivalente.

Las diferencias entre variables categóricas se analizaron mediante el test de la Chi-cuadrado con la corrección de Yates, utilizándose la prueba exacta de Fisher cuando alguna de las frecuencias esperadas era inferior a cinco.

Las diferencias entre variables cuantitativas se analizaron mediante el test de Student o el análisis de la varianza cuando se compararon más de dos variables. Cuando no se cumplieron las condiciones para las pruebas paramétricas, se utilizaron las pruebas no paramétricas correspondientes (U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis).

Para el análisis bivalente de los factores asociados con la mortalidad y el cálculo de las OR y sus intervalo de confianza al 95% se utilizó regresión logística.

Los análisis de supervivencia se realizaron mediante las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.

4.4.4. Análisis multivariante.

El análisis multivariante de los factores relacionados con la mortalidad se realizó mediante un modelo de regresión logística tipo paso a paso hacia delante. Para el de los factores relacionados con la duración de las estancias en UCI y en el hospital se utilizaron modelos de regresión lineal. Para evitar asociaciones espurias, las variables introducidas en los modelos multivariantes fueron aquellas estadísticamente significativas en el análisis bivalente y las consideradas clínicamente relevantes.

4.4.5. Expresión de resultados.

Los resultados se han presentado como *odds ratio* (OR) e intervalo de confianza al 95% (IC95%). El umbral para considerar la significación estadística fue definido como $p < 0,05$.

4.4.6. Paquete estadístico.

El protocolo de recogida de datos se informatizó en formato SPSS (versión 12, SPSS, Chicago, IL, EEUU). Para el análisis se emplearon los programas R (R Core Team [2015] R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>) y SPSS.

V. RESULTADOS.

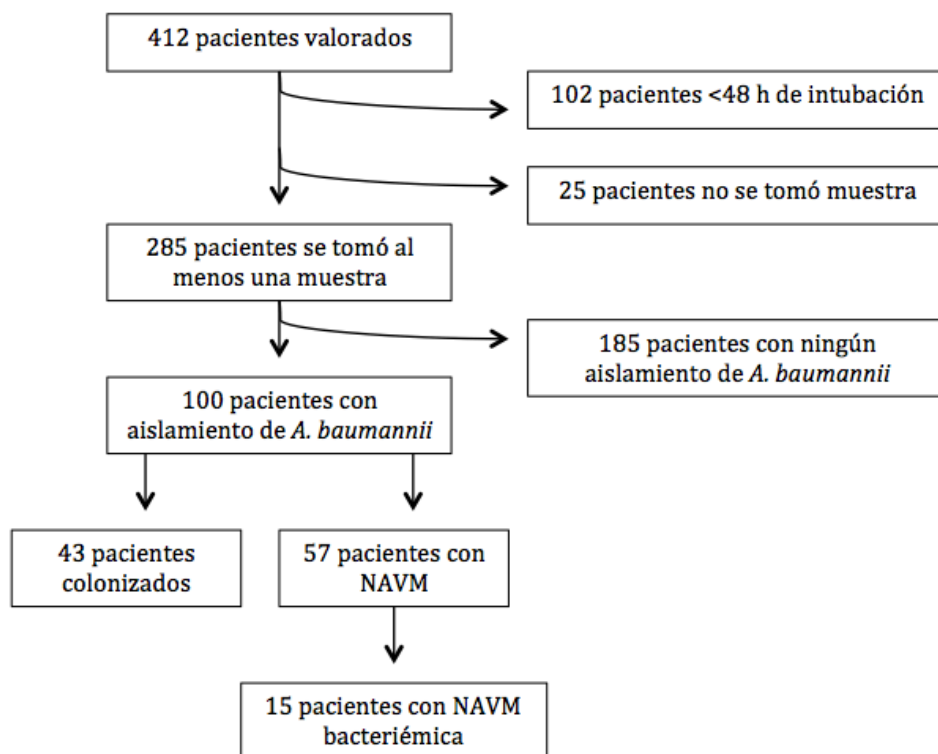
5.1. OBJETIVO 1. Evaluar la mortalidad asociada a la colonización de vías respiratorias por *A. baumannii* vs. la de las infecciones respiratorias por esta bacteria, con o sin bacteriemia, en los pacientes críticos con ventilación mecánica.

5.1.1. Estudio epidemiológico. Descripción de la población de estudio.

Durante el periodo de estudio se reclutaron 285 pacientes, de los cuales 100 cumplieron todos los criterios de inclusión y quedaron definitivamente incluidos en el estudio. De estos 100, 43 fueron clasificados como colonización de vías respiratorias y 57 desarrollaron una neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM) por *Acinetobacter baumannii*; 15 de los casos de NAVM tuvieron una bacteriemia por *A. baumannii* concomitante al diagnóstico de NAVM.

El plazo de tiempo que tardaron los pacientes en presentar el primer cultivo de ATB positivo para *A. baumannii* fue de 9 (5-14) días. El diagnóstico de NAVM desde el inicio del seguimiento se produjo a los 11 (7-17,75) días.

Figura 3. Diagrama de flujo de la selección de pacientes incluidos.



5.1.1.1. Variables demográficas.

La edad mediana de los pacientes con NAVM fue 51 (43,5-69,5) años y la de los pacientes colonizados fue 66 (43-70) años.

Del grupo de los colonizados, 17 (39,5%) eran mujeres y 26 (60,5%) eran varones. En los pacientes con NAVM, 22 (38,6%) eran mujeres y 35 (61,4%), varones.

La edad mediana de las mujeres fue 55 (41-65) años y la de los hombres fue 61 (45,5-72) años. No hubo diferencias significativas en la distribución de la edad por sexos en cada uno de los grupos.

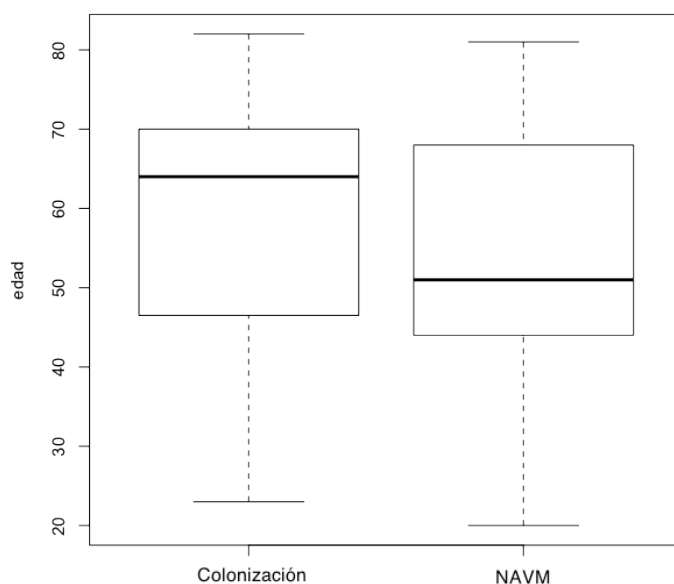


Gráfico 1. Distribución de la edad en los pacientes con colonización y NAVM.

5.1.1.2. Características clínicas basales al ingreso en la UCI y complicaciones durante el ingreso.

Los pacientes con NAVM tenían un índice de Charlson de 0 (0-2) y una puntuación en el *score* APACHE II al ingreso en UCI de 17 (13-20) puntos, mientras que el índice de Charlson de los colonizados fue de 1 (0-2) y su puntuación en el APACHE II de 17 (12-21,25) puntos. Las comorbilidades más frecuentes fueron: insuficiencia cardiaca, EPOC, diabetes mellitus y antecedente de neoplasia maligna sin metástasis (Tabla 12). todas las comorbilidades analizadas se distribuyeron de manera similar en ambos grupos de pacientes.

Tabla 11. Características demográficas y clínicas de los pacientes con NAVM o colonización de vías respiratorias por *A. baumannii*.

	Colonización (n=43)	NAVM (n=57)	<i>p</i>	OR (95%CI)
Edad Años. md (IQR)	66 (43-70)	51 (43,5-69,5)	0,186	-
Mujer n (%)	17 (39,5)	22 (38,6)	0,920	-
Charlson score md (IQR)	1 (0-2)	0 (0-2)	0,529	-
APACHE II md (IQR)	17 (12-21,25)	17 (13-20)	0,947	-
Fracaso renal agudo n (%)	13 (30,2)	27 (47,4)	0,085	2,07 (0,90-4,77)
Shock séptico n (%)	17 (39,5)	30 (52,6)	0,194	-
Cirugía n (%)	19 (44,2)	38 (66,7)	0,025	2,52 (1,11-5,71)

Tabla 12. Comorbilidad previa de los pacientes con NAVM o colonización de vías respiratorias por *A. baumannii*.

	Colonizados (n=43)	NAVM (n=57)	<i>p</i>
Índice de Charlson	1 (0—2)	0 (0-2)	0,529
Cardiopatía isquémica	1 (2,3)	1 (1,8)	0,840
Insuficiencia cardiaca	7 (16,3)	6 (10,5)	0,397
E. vascular periférica	1 (2,3)	2 (3,5)	0,731
E. cerebro-vascular	3 (6,9)	2 (3,5)	0,431
EPOC⁽¹⁾	5 (11,6)	6 (10,5)	0,862
Demencia	0	1 (1,8)	0,383
Conectivopatía	1 (2,3)	0	0,247
Úlcus péptico	2 (4,6)	0	0,100
Hepatopatía leve	0	2 (3,5)	0,215
Hepatopatía moderada-grave	1 (2,3)	2 (3,5)	0,731
DM⁽²⁾ sin LOD⁽³⁾	8 (18,6)	9 (15,8)	0,711
DM⁽²⁾ con LOD⁽³⁾	1 (2,3)	2 (3,5)	0,731
Hemiplejia	0	0	-
E. renal crónica	1 (2,3)	2 (3,5)	0,731
Neoplasia maligna	5 (11,6)	4 (7)	
Neoplasia maligna con metástasis	0	0	-
Leucemia	2 (4,6)	0	0,100
Linfoma	0	0	-
SIDA	0	1 (1,8)	0,383

(1) Enfermedad pulmonar obstructiva crónica. (2) Diabetes mellitus. (3) Lesión de órgano diana.

Los diagnósticos que motivaron el ingreso en la UCI fueron diversos y aparecen recogidos en la tabla 13, correspondiendo a patología médica en 46 (46%) casos, a patología quirúrgica en 25 (25%) casos y a patología traumatológica en 29 (29%) casos (Gráfico 2).

Tabla 13. Distribución de los diagnósticos principales al ingreso en la UCI en pacientes colonizados y con NAVM por *A. baumannii*.

	Colonización (n=43)	NAVM (n=57)	p
Causa médica n (%)	24 (52,2)	22 (38,6)	0,084
Causa quirúrgica n (%)	8 (18,6)	17 (29,8)	0,200
Causa traumatológica n (%)	11 (25,6)	18 (31,6)	0,510
Politraumatismo n (%)	8 (18,6)	11 (19,3)	0,903
TCE * n (%)	0 (0)	5 (8,8)	0,046
Cirugía cardíaca n (%)	2 (4,7)	3 (5,3)	0,889
Neurocirugía n (%)	1 (2,3)	2 (3,5)	0,731
Quemados n (%)	3 (7)	2 (3,5)	0,431
ACV ** n (%)	4 (9,3)	6 (10,5)	0,840
NAC *** n (%)	9 (20,9)	6 (10,5)	0,149
Sepsis n (%)	2 (4,7)	1 (1,8)	0,401
Infección SNC **** n (%)	1 (2,3)	3 (5,3)	0,458
Cirugía miscelánea ***** n (%)	5 (11,6)	12 (21,1)	0,214
Patología médica miscelánea ***** n (%)	8 (18,6)	6 (10,5)	0,249

* Traumatismo cráneo-encefálico. ** Accidente cerebrovascular. *** Neumonía adquirida en la comunidad. **** Infección de sistema nervioso central. ***** Cirugía miscelánea: cistectomía radical (1), peritonitis terciaria (1), abdomen agudo (5), postoperatorio de cirugía gastrointestinal electiva (8), cirugía torácica (1), gangrena de Fournier (1). ***** Patología médica miscelánea: status epiléptico (3), intoxicación por benzodiazepinas (1), agitación psicomotriz (1), síndrome de Guillain-Barré (2), fallo cardíaco (1), bradicardia (1), broncoespasmo (1), parada cardíaca tras cirugía cardíaca (1), aspergilosis pulmonar invasora (1), derrame pleural (1), endocarditis infecciosa por *Staphylococcus aureus* (1).

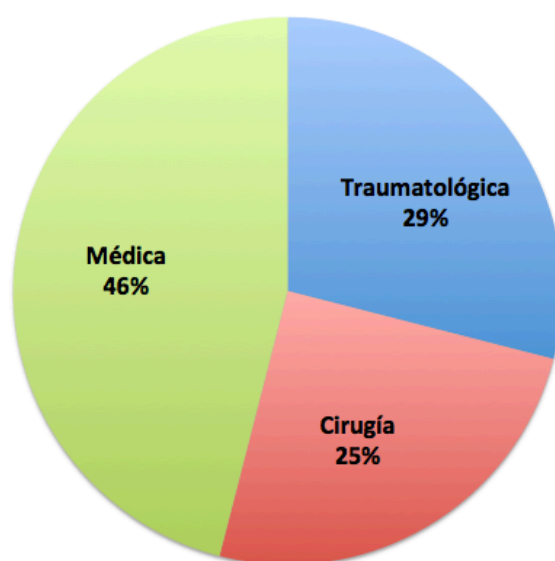


Gráfico 2. Distribución del tipo de patología que motivó el ingreso en la UCI.

Durante su ingreso en UCI, 40 (40%) pacientes presentaron un fracaso renal agudo y 43 (43%) sufrieron un shock séptico. Ambas complicaciones alcanzaron mayor proporción en el grupo de los pacientes con NAVM por *A. baumannii*, sin alcanzar diferencias significativas con los pacientes colonizados (tabla 11).

Los pacientes incluidos recibieron soporte con ventilación mecánica invasiva durante una mediana de 20 (11-30,75) días. Esta duración fue de 14,5 (10-29,75) días en los pacientes colonizados y de 22,5 (12,75-31,75) días en los pacientes con NAVM, no existiendo diferencias significativas ($p=0,21$). Eliminando los pacientes que fallecieron antes de ser extubados ($n=26$), tampoco existieron diferencias en la duración de la ventilación mecánica entre ambos grupos de pacientes ($p=0,35$). La densidad de incidencia de NAVM por *A. baumannii* en los pacientes incluidos fue de 28,5 casos/1000 días de ventilación mecánica.

5.1.1.3. Diagnóstico de colonización respiratoria, NAVM y bacteriemia por *A. baumannii*.

Los pacientes con NAVM obtuvieron una puntuación mediana en la escala CPIS de 6 (6-7). Ningún paciente del grupo clasificado como colonizados alcanzó una puntuación de 6 con aislamiento de *A. baumannii* en ATB. Quince pacientes tuvieron una bacteriemia por *A. baumannii* concomitante al diagnóstico de NAVM. Todos ellos tenían una muestra de ATB con aislamiento de *A. baumannii* en tiempo no superior a 72 horas de diferencia con el hemocultivo. exceptuando cuatro (en dos casos no se

extrajo la muestra de ATB por inestabilidad clínica y en dos casos la muestra se perdió durante el procesado). Todos estos pacientes habían presentado colonización de vías respiratorias por *A. baumannii* y tenían una puntuación CPIS ≥ 6 , lo que permitió el diagnóstico en ausencia de la muestra respiratoria conjuntamente con el hemocultivo positivo.

5.1.1.4. Tratamiento antimicrobiano.

La mayoría de los pacientes habían recibido tratamiento antimicrobiano antes de que se aislara por primera vez *A. baumannii*, sin que existieran diferencias entre pacientes colonizados y los que desarrollaron NAVM (Tabla 14). Cuarenta y tres pacientes habían recibido carbapenemas, siendo su uso más frecuente en pacientes que desarrollaron NAVM que en los que sólo estuvieron colonizados (54,4% vs. 27,9%, $p=0,008$)

Tabla 14. Tratamiento antimicrobiano previo a la adquisición de *A. baumannii* en pacientes colonizados y con NAVM por *A. baumannii*.

	Colonizados (n=43)	NAVM (n=57)	p
Antibioterapia previa	40 (93)	53 (92,9)	0,994
Penicilina/Ampicilina	0	4 (7)	0,076
Cloxacilina	3 (6,9)	5 (8,7)	0,743
Amoxicilina-clavulánico	11 (25,5)	18 (31,6)	0,513
Piperacilina-tazobactam	10 (23,2)	25 (43,8)	0,032
Sulbactam	0	1 (1,8)	0,383
Ceftriaxona/cefotaxima	9 (20,9)	10 (17,5)	0,669
Cefepima	0	7 (12,3)	0,017
Imipenem	5 (11,6)	14 (24,6)	0,103
Meropenem	7 (16,3)	17 (29,8)	0,033
Ertapenem	1 (2,3)	2 (4,6)	0,731
Aztreonam	0	0	-
Ciprofloxacino	2 (4,6)	8 (14)	0,121
Levofloxacino	12 (27,9)	6 (10,5)	0,025
Macróido	4 (4,6)	6 (10,5)	0,840
Aminoglucósido	1 (2,3)	2 (3,5)	0,731
Vancomicina	6 (13,9)	22 (38,6)	0,007
Teicoplanina	0	0	-
Linezolid	6 (13,9)	14 (24,5)	0,189
Daptomicina	1 (2,3)	1 (1,8)	0,840
Colistina	3 (6,9)	7 (16,2)	0,381
Tigeciclina	0	0	-
Clindamicina	0	4 (7)	0,076
Metronidazol	0	1 (1,8)	0,383

Cincuenta y tres (92,9%) pacientes con NAVM recibieron un tratamiento apropiado con colistina intravenosa. Trece (30,2%) pacientes colonizados recibieron colistina en algún momento del seguimiento. La duración mediana en los pacientes colonizados de este tratamiento fue de 8 (3-17) días, mientras que en los pacientes con NAVM 14 (10-20,25) días ($p=0,96$). Eliminando a los pacientes que fallecieron mientras realizaban tratamiento con colistina, la duración mediana en los colonizados fue de 10 (2-24) días y en el grupo de pacientes con NAVM fue de 14 (10-21,5) días ($p=0,39$). Dentro de los pacientes con NAVM, aquellos que tuvieron una bacteriemia recibieron colistina durante 14 (9,25-19,25) días, sin diferencias con los 14 (10-21,75) de los pacientes con NAVM no bacteriémica.

La dosis más utilizada fue 6 millones de unidades (MU) de colistina al día, repartidas en tres dosis de 2 MU, siendo recibida por 43 (74,1%) pacientes. Cinco pacientes recibieron menos dosis de colistina debido a que presentaban insuficiencia renal. Cuatro pacientes recibieron dosis de 9 MU diarios (3 MU cada 8 horas) y uno recibió 12 MU al día. En ningún caso se utilizó dosis de carga.

El tiempo transcurrido entre el diagnóstico de NAVM y el inicio del tratamiento con colistina fue de 1 (0-3,5) días en los pacientes con bacteriemia y de 2,5 (0-4) en los pacientes sin bacteriemia ($p=0,41$), como se refleja en el gráfico 3.

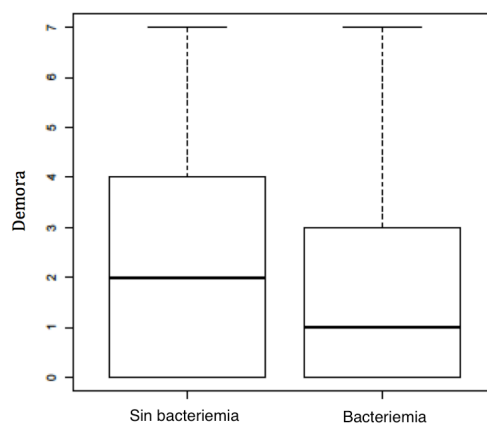


Gráfico 3. Demora en días de la antibioterapia apropiada en pacientes con y sin bacteriemia.

Los pacientes que presentaron colonización respiratoria por *A. baumannii* antes de desarrollar la NAVM recibieron tratamiento con colistina más tardíamente que aquellos en los que el primer aislamiento de *A. baumannii* correspondió al diagnóstico

de NAVM: 2 (0-3) días vs. 1 (0-4) días; no obstante, las diferencias no fueron significativas ($p=0,37$). (Gráfico 4)

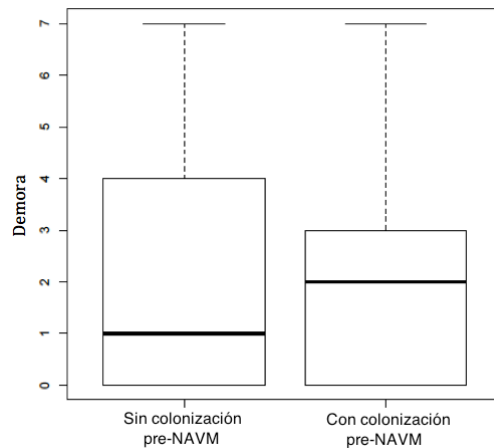


Gráfico 4. Demora en días del tratamiento antibiótico correcto en pacientes con y sin colonización previa a la NAVM.

5.1.1.5. Aspectos microbiológicos.

5.1.1.5.1. Concentración bacteriana.

Los cultivos cuantitativos procedentes de pacientes colonizados tuvieron una concentración bacteriana mediana de 7,85 (7,85-8,55) \log_{10} UFC/ml y los procedentes de pacientes con NAVM presentaron una concentración mediana de 8,00 (6,84-8,66) \log_{10} UFC/ml ($p=0,878$).

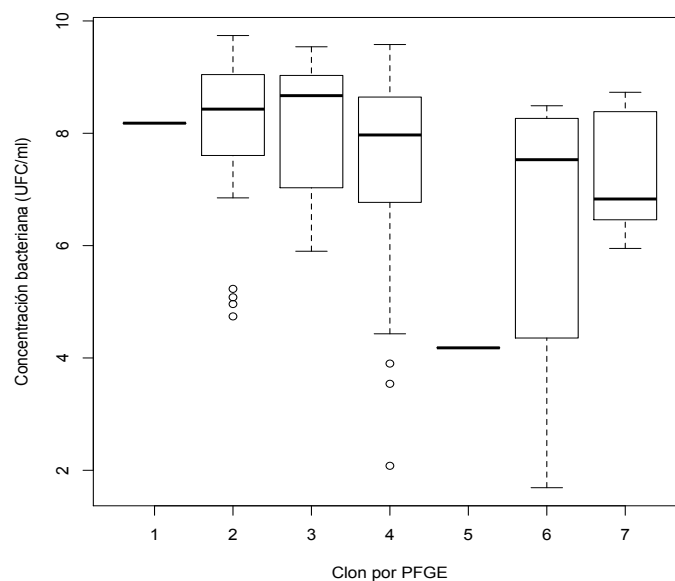


Gráfico 5. Distribución de la concentración bacteriana en muestras de ATB de distintos clones.

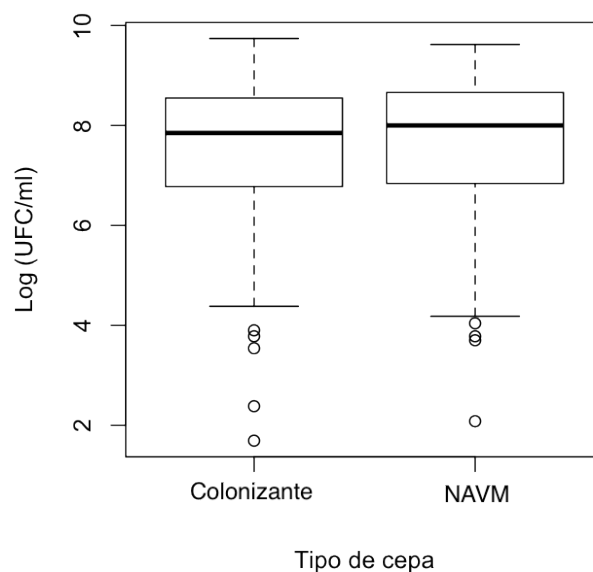


Gráfico 6. Distribución de la concentración bacteriana en muestras respiratorias en pacientes colonizados o con NAVM.

5.1.1.5.2. Otros aislamientos microbiológicos.

Se aislaron microorganismos diferentes de *A. baumannii* en 18 muestras de ATB de pacientes con colonización respiratoria y en 20 muestras de ATB del grupo de pacientes con NAVM ($p=0,49$) durante el seguimiento. Los microorganismos aislados en el grupo de los colonizados fueron: *Staphylococcus aureus* (8), *Proteus mirabilis* (5), *Pseudomonas aeruginosa* (4), *Escherichia coli* (2), Estafilococos coagulasa-negativo (2), *Serratia plymuthica* (1), *Citrobacter koseri* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1), y *Candida* spp. (4); cinco pacientes tuvieron más de un aislamiento. Los microorganismos aislados en el grupo de los pacientes con NAVM fueron: *P. aeruginosa* (10), *S. aureus* (4), *K. pneumoniae* (4), *Serratia marcescens* (2), *Enterobacter cloacae* (2), *Enterobacter aerogenes* (1), *C. koseri* (2), *Propionibacterium acnes* (2), *Streptococcus pneumoniae* (1), *Haemophilus influenzae* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (1), y *Candida* spp. (7); once pacientes tuvieron más de un aislamiento. Además, 32 pacientes (10 colonizados vs. 22 pacientes del grupos con NAVM, $p=0,079$) presentaron 41 episodios de bacteriemia por otros microorganismos: Estafilococo coagulasa-negativo (15), *S. aureus* (4), *E. coli* (3), *K. pneumoniae* (2), *Enterococcus faecalis* (2), *E. faecium* (2), *S. pneumoniae* (2), *P. acnes* (2),

Streptococcus milleri (2), *E. cloacae* (1), *M. morganii* (1), *Neisseria meningitidis* (1), *Listeria monocytogenes* (1), y *Candida* spp. (3); cuatro pacientes tuvieron más de un aislamiento microbiológico.

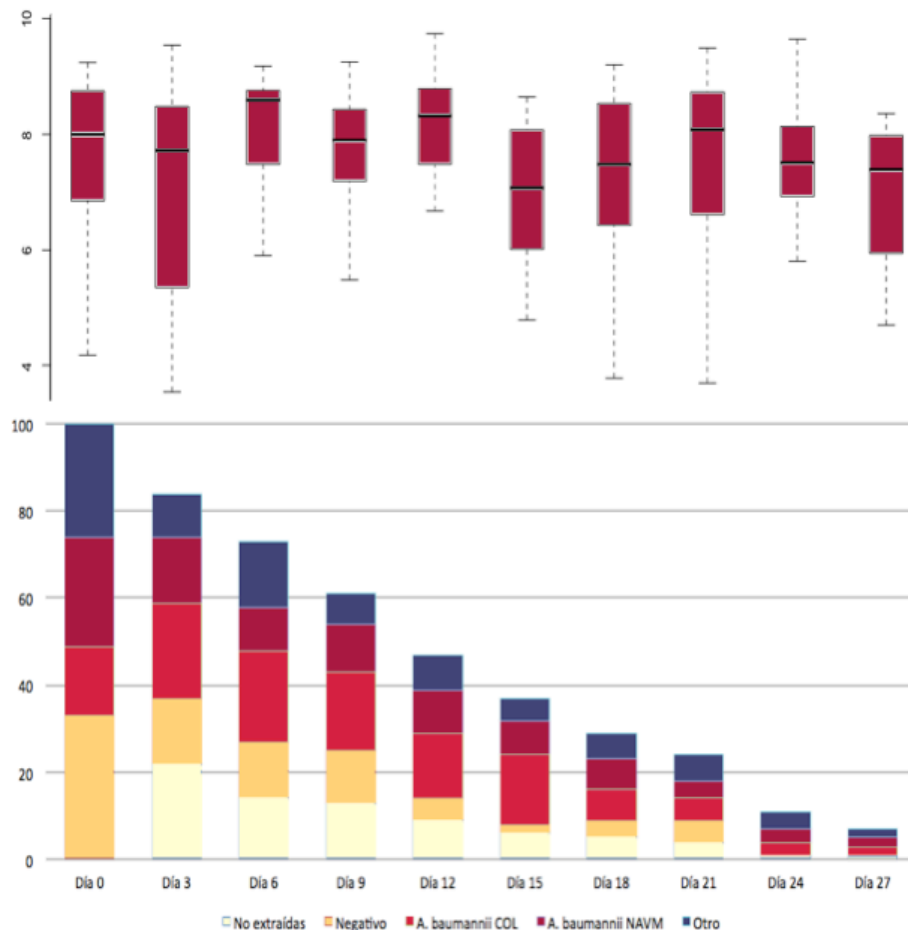


Gráfico 7. Evolución temporal de la proporción de aislamientos microbiológicos y la concentración bacteriana de *A. baumannii* a lo largo del seguimiento.

5.1.1.6. Evolución clínica y pronóstico.

5.1.1.6.1. Mortalidad.

En el grupo de los pacientes con colonización respiratoria, fallecieron 12 (27,9%) pacientes en el plazo de 30 días, mientras que en el grupo con NAVM, lo hicieron 14 (24,6%) ($p=0,7$). La mediana de tiempo transcurrido desde el diagnóstico de NAVM hasta la muerte fue de 17 (7-21) días.

En el análisis de supervivencia entre pacientes con colonización respiratoria y pacientes con NAVM no se encontraron diferencias ($p=0,34$) (Figura 4).

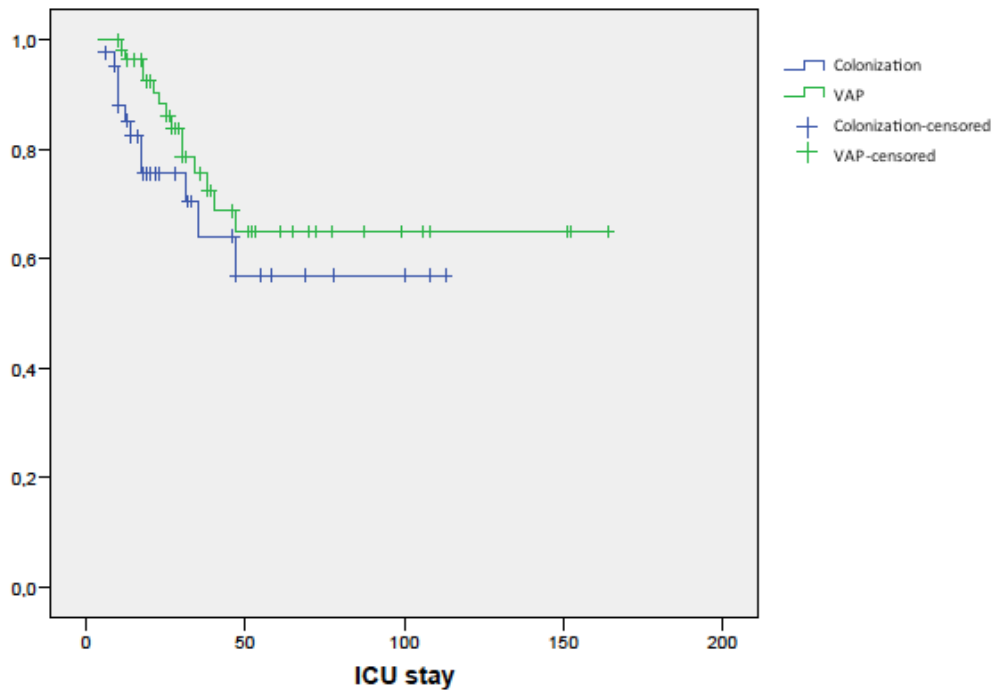


Figura 4. Supervivencia en pacientes con colonización o NAVM.

5.1.1.6.2. Estancia en UCI.

La estancia en UCI mediana fue de 17 (8-33) días para el conjunto de los pacientes, siendo de 9 (6-22) días en los pacientes colonizados y de 21,5 (11,5-42,75) días en los pacientes con NAVM ($p=0,004$),

5.1.1.6.3. Estancia hospitalaria.

La duración de la estancia hospitalaria fue de 53 (20-73) días para el conjunto de los pacientes, siendo de 28 (15,75-52,75) días para los colonizados y de 35 (25-56) días para los pacientes con NAVM ($p=0,5$).

5.1.2. Factores relacionados con la mortalidad y estancia en UCI.

5.1.2.1. Factores relacionados con la mortalidad. Análisis bivalente y multivariante.

Los factores relacionados con una mayor mortalidad a 30 días en la población global aparecen reflejados en la tabla 15. El índice de Charlson y el desarrollo de shock séptico se comportaron como factores independientes de mortalidad (tabla 16).

Tabla 15. Factores asociados con mortalidad en la muestra global (análisis bivalente).

Variable	Fallecidos (n=26)	Supervivientes (n=74)	<i>p</i>	OR (IC95%)
Sexo femenino n (%)	9 (34,6)	17 (65,4)	0,595	0,776 (0,306-1,971)
Edad mediana (IQR)	61,4 (48,5-73)	53,6 (43-66)	0,040	1,03 (1,002-1,06)
Índice de Charlson mediana (IQR)	2,07 (1-3)	0,71 (0-1)	<0,001	2,21 (1,47-3,31)
APACHE II mediana (IQR)	19,48 (17-20)	16,26 (12-19,5)	0,048	1,07 (1,00-1,14)
Ingreso por causa médica n (%)	16 (61,5)	30 (40,5)	0,068	2,34 (0,939-5,867)
Ingreso por causa quirúrgica n (%)	7 (26,9)	18 (24,3)	0,792	1,14 (0,415-3,167)
Ingreso por causa traumatológica n (%)	3 (11,5)	26 (35,1)	0,031	0,241 (0,066-0,879)
Shock séptico n (%)	20 (76,9)	27 (36,5)	0,001	5,802 (2,076-16,217)
Fallo renal agudo n (%)	19 (73,1)	21 (28,4)	<0,001	6,85 (2,512-18,68)
Tto. con colistina n (%)	20 (76,9)	46 (62,2)	0,177	2,029 (0,727-5,662)
NAVM n (%)	14 (53,8)	43 (58,1)	0,706	0,841 (0,342-2,066)
Bacteriemia n (%)	6 (23,1)	9 (12,2)	0,187	2,16 (0,687-6,830)

Tabla 16. Factores asociados con la mortalidad en la muestra global: análisis multivariante mediante regresión logística.

	Muerte (n=26)	<i>p</i>	OR (IC95%)
Índice de Charlson mediana (IQR)	2,07 (1-3)	<0,001	2,44 (1,5-3,97)
Shock séptico n (%)	20 (76,9)	0,001	7,21 (2,18-23,83)
NAVM n (%)	14 (53,8)	0,709	0,81 (0,26-2,44)

Entre los pacientes que desarrollaron NAVM, las variables que se relacionaron con una mayor mortalidad en el análisis bivalente fueron el índice de Charlson, el shock séptico, el fracaso renal agudo y el ingreso por causa distinta a la traumatológica (Tabla 17).

Tabla 17. Factores relacionados con la mortalidad en pacientes con NAVM por *A. baumannii*: análisis bivalente y multivalente mediante regresión logística.

Variable	Fallecidos (n=14)	Supervivientes (n=43)	Bivalente		Multivalente	
			OR (IC95%)	p	OR (IC95%)	p
Sexo femenino n (%)	7 (50)	15 (34,9)	1,87 (0,55-6,33)	0,316		
Edad mediana (IQR)	58 (43,25-76,75)	49 (43-65)	1,03 (0,99-1,07)	0,154		
Índice de Charlson mediana (IQR)	2 (0,75-2,25)	0 (0-1)	1,8 (1,1-2,9)	0,019	1,76 (1,02-3,05)	0,042
APACHE II mediana (IQR)	19,5 (17,75-20,25)	15,5 (12,25-19,5)	1,05 (0,96-1,14)	0,294		
Ingreso por causa médica n (%)	8 (57,1)	14 (32,6)	2,76 (0,8-9,5)	0,107		
Ingreso por causa quirúrgica n (%)	5 (35,7)	12 (27,9)	1,43 (0,4-5,16)	0,580		
Ingreso por causa traumatológica n (%)	1 (7,1)	17 (39,5)	0,12 (0,01-0,98)	0,048		
Shock séptico n (%)	11 (78,6)	19 (44,2)	4,63 (1,13-18,99)	0,033		
Fracaso renal agudo n (%)	11 (78,6)	16 (37,2)	6,18 (1,49-25,56)	0,012	7,66 (1,43-41,01)	0,017
Antibioterapia apropiada n (%)	13 (92,9)	40 (93,0)	0,97 (0,09-10,2)	0,983		
Bacteriemia n (%)	6 (42,9)	9 (20,9)	2,83 (0,78-10,28)	0,113	5,91(1,14-30,51)	0,034

La bacteriemia no alcanzó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en el análisis bivalente, pero sí lo hizo tras ajustar en el multivalente por el fracaso renal agudo y el índice de Charlson, siendo este el modelo más parsimonioso para explicar la mortalidad.

El análisis de supervivencia que comparó pacientes con NAVM bacteriémica y no bacteriémica reveló una menor supervivencia en los primeros ($p=0,027$) (Figura 5). Esta diferencia se mantenía en el análisis multivalente mediante regresión de Cox, en el que además se observa cómo el tratamiento con colistina es un factor protector de mortalidad (HR []).

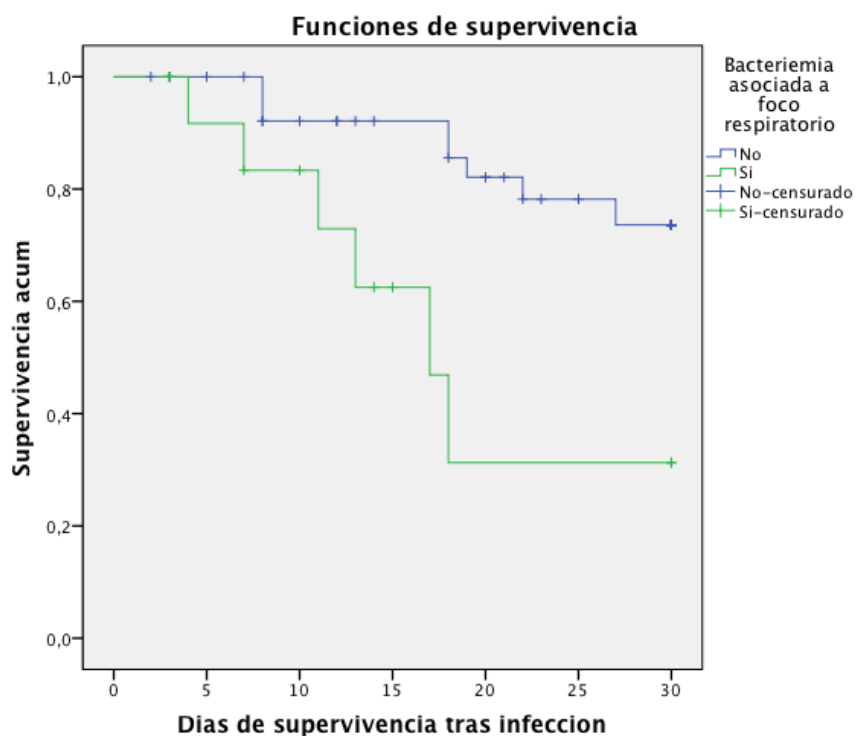


Figura 5. Supervivencia en pacientes con NAVM con y sin bacteriemia.

Tabla 18. Factores relacionados con la supervivencia en pacientes con NAVM por *A. baumannii*: análisis bivalente y multivalente mediante regresión de Cox.

Variable	Fallecidos (n=14)	Supervivientes (n=43)	Bivalente		Multivalente	
			HR (IC95%)	p	HR (IC95%)	p
Sexo femenino n (%)	7 (50)	15 (34,9)	1,22 (0,42-3,48)	0,710		
Edad mediana (IQR)	58 (43,25-76,75)	49 (43-65)	1,01 (0,97-1,04)	0,580		
Índice de Charlson mediana (IQR)	2 (0,75-2,25)	0 (0-1)	1,27 (0,95-1,7)	0,107		
APACHE II mediana (IQR)	19,5 (17,75-20,25)	15,5 (12,25-19,5)	1,01 (0,95-1,08)	0,632		
Ingreso por causa médica n (%)	8 (57,1)	14 (32,6)	2,27 (0,79-6,57)	0,129		
Ingreso por causa quirúrgica n (%)	5 (35,7)	12 (27,9)	1,38 (0,46-4,13)	0,563		
Ingreso por causa traumatológica n (%)	1 (7,1)	17 (39,5)	0,15 (0,02-1,12)	0,064		
Shock séptico n (%)	11 (78,6)	19 (44,2)	2,26 (0,63-8,13)	0,212		
Fracaso renal agudo n (%)	11 (78,6)	16 (37,2)	3,5 (0,97-12,54)	0,055	3,88 (1,06-14,21)	0,04
Colistina n (%)	13 (92,9)	40 (93,0)	0,03 (0,002-0,47)	0,013	0,02 (0,001-0,72)	0,033
Bacteriemia n (%)	6 (42,9)	9 (20,9)	4,49 (1,52-13,3)	0,007	4,67 (1,53-14,25)	0,007

Entre los pacientes colonizados que no desarrollaron NAVM, las variables que se relacionaron con una mayor mortalidad en el análisis bivalente fueron el sexo masculino, el índice de Charlson, la puntuación APACHE II al ingreso, el shock séptico, el fracaso renal agudo y el tratamiento con colistina (tabla 19).

Tabla 19. Factores relacionados con la mortalidad en pacientes con colonización respiratoria por *A. baumannii* (análisis bivalente).

Variable	Fallecidos (n=12)	Supervivientes (n=31)	<i>p</i>	OR (IC95%)
Sexo femenino n (%)	2 (16,7)	15 (48,4)	0,070	0,213 (0,04-1,137)
Edad mediana (IQR)	68,5 (53,5-73)	62 (43-70)	0,146	1,038 (0,987-1,091)
Índice de Charlson mediana (IQR)	2,5 (1-3,75)	0 (0-1)	0,003	3,117 (1,47-6,612)
APACHE II mediana (IQR)	19 (16-24)	15 (10-21)	0,065	1,12 (0,993-1,264)
Ingreso por causa médica n (%)	8 (66,7)	16 (51,6)	0,376	1,875 (0,446-7,54)
Ingreso por causa quirúrgica n (%)	2 (16,7)	6 (19,4)	0,839	0,833 (0,143-4,845)
Ingreso por causa traumática n (%)	2 (16,7)	9 (29)	0,411	0,489 (0,089-2,689)
Shock séptico n (%)	9 (75)	8 (25,8)	0,006	8,625 (1,859-40,009)
Fracaso renal agudo n (%)	8 (66,7)	5 (16,1)	0,003	10,4 (2,24-48,275)
Tratamiento con colistina n (%)	7 (58,3)	6 (19,4)	0,017	5,833 (1,364-29,941)

Tabla 20. Factores asociados con la mortalidad en los pacientes con colonización respiratoria por *A. baumannii* (análisis multivariante).

	Muerte (n=14)	<i>p</i>	OR (IC95%)
Índice de Charlson mediana (IQR)	2,5 (1-3,75)	0,004	3,29 (1,45-7,47)
Fallo renal agudo n (%)	8 (66,7)	0,011	12,8 (1,77-92,23)

Respecto a los modelos multivariantes realizados mediante regresión logística, cabe destacar que el shock séptico y el fracaso renal agudo se comportaron como variables colineales, siendo seleccionadas en todos los modelos construidos (para la

muestra global, para la de pacientes colonizados y para la de pacientes con NAVM) como factores de riesgo de mortalidad cuando se analizaron por separado, con mínimas diferencias en la capacidad discriminativa de los distintos modelos.

5.1.2.2. Factores relacionados con la estancia en UCI. Análisis bivariante y multivariante.

Los factores relacionados con la estancia en UCI en el conjunto de los pacientes estudiados aparecen recogidos en la tabla 21. El desarrollo de NAVM por *A. baumannii* ($p=0,004$) y una mayor edad ($p=0,01$) se relacionaron de forma independiente con una estancia en UCI más prolongada. La duración de la estancia entre el ingreso en UCI y el desarrollo de colonización o NAVM por *A. baumannii* no se relacionaron con la duración de la estancia en UCI ($p=0,1$).

Los factores relacionados con la estancia prolongada en los subgrupos de pacientes con colonización respiratoria o NAVM aparecen reflejados en las tablas 22 y 23, respectivamente.

Tabla 21. Factores asociados con estancia en UCI prolongada en la muestra global de pacientes incluidos ($n=67$).

Variable	Análisis bivariante		Análisis multivariante	
	p	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)
NAVM	0,007	1,81 (1,18-2,79)	0,004	1,88 (1,23-2,88)
Edad	0,041	1,01 (1,00-1,03)	0,010	1,01 (1,00-1,03)
Sexo femenino	0,097	1,45 (0,93-2,26)	-	-
Índice de Charlson	0,257	1,45 (0,90-1,44)	-	-
APACHE II	0,03	1,04 (1,00-1,07)	0,47	1,01 (0,98-1,05)
Shock séptico	0,011	1,80 (1,15-2,81)	0,204	1,35 (0,85-2,15)
Fracaso renal agudo	0,015	1,84 (1,13-3,01)	0,107	1,5 (0,91-2,47)
Bacteriemia	0,98	0,99 (0,50-1,97)	-	-

Tabla 22. Factores asociados con mayor estancia en UCI en los pacientes con NAVM (n=40).

Variable	Análisis bivariante		Análisis multivariante	
	p	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)
Edad	0,058	1,02 (0,99-1,04)	0,077	1,02 (0,99-1,03)
Sexo femenino	0,219	1,43 (0,80-2,57)	-	-
Índice de Charlson	0,410	1,12 (0,85-1,46)	-	-
APACHE II	0,365	1,02 (0,98-1,06)	-	-
Shock séptico	0,176	1,46 (0,84-2,56)	-	-
Fracaso renal agudo	0,067	1,70 (0,96-3,00)	0,088	1,61 (0,92-2,82)
Bacteriemia	0,381	0,73 (0,36-1,48)	-	-

Tabla 23. Factores asociados con estancia en UCI prolongada en el grupo de pacientes con colonización respiratoria (n=27).

Variable	Análisis bivariante		Análisis multivariante	
	p	OR (IC95%)	p	OR (IC95%)
Edad	0,120	1,01 (0,99-1,03)	-	-
Sexo femenino	0,042	1,92 (1,03-3,59)	0,049	1,78 (1,00-3,22)
Índice de Charlson	0,934	1,02 (0,52-2,04)	-	-
APACHE II	0,022	1,06 (1,01-1,12)	0,027	1,05 (1,00-1,10)
Shock séptico	0,078	1,99 (0,91-4,31)	-	-
Fracaso renal agudo	0,640	1,28 (0,43-3,80)	-	-

5.2. OBJETIVO 2. Comparar la presencia de determinados factores de virulencia entre las cepas clínicas colonizantes y productoras de infección: formación de *biofilm*, motilidad, expresión de *ompA*, adquisición de hierro y presencia de hemolisinas.

5.2.1. Relación clonal de las cepas.

5.2.1.1. Elección de las cepas.

Para los estudios de virulencia, se eligió la primera cepa procedente de un cultivo de ATB en cada paciente. De estas, 59 pertenecían a pacientes con colonización respiratoria y 41 a pacientes con NAVM. Dieciséis de los colonizados desarrollaron ulteriormente una NAVM: en estos casos se tomó también la primera muestra de ATB del mismo día o inmediatamente posterior a la fecha del diagnóstico de neumonía. No obstante, en tres de estos pacientes el diagnóstico de NAVM se produjo sin que hubiera una muestra de ATB concomitante o en las primeras 72 horas (basándose en la presencia de colonización previa y de un hemocultivo coincidente con el diagnóstico de NAVM); por tanto, solo se añadieron 13 cepas a las 100 previas. Las 15 cepas procedentes de hemocultivos también fueron seleccionadas para su análisis.

5.2.1.2. Relación clonal según REP-PCR.

Se obtuvieron 3 clones mediante la técnica de REP-PCR, denominados clones A, B y C. El 98,5% de los aislados pertenecía al clon A.

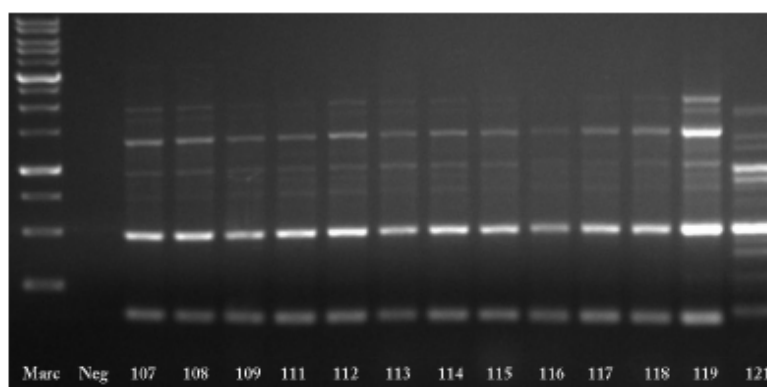


Figura 6. Patrón de bandas en electroforesis de REP-PCR de varias cepas analizadas. Las 12 primeras pertenecen al clon A, mientras que la última pertenece al clon C.

5.2.1.3. Relación clonal según PFGE.

Se obtuvieron siete clones diferentes mediante esta técnica, a los que se denominó con cifras del 1 al 7. El clon 5 se correspondió con el clon B por REP-PCR y el clon 1, se correspondió con el clon C por REP-PCR. La distribución de cepas en los mismos fue la que se representa en la tabla 24.

Tabla 24. Distribución por PFGE de las cepas analizadas.

Clon por PFGE							
Tipo de cepa	1	2	3	4	5	6	7
Colonizantes	-	16	1	32	-	3	5
NAVM	1	12	5	30	1	2	4
Bacteriémica	-	3	1	9	-	-	2
TOTAL	1	31	7	71	1	5	11

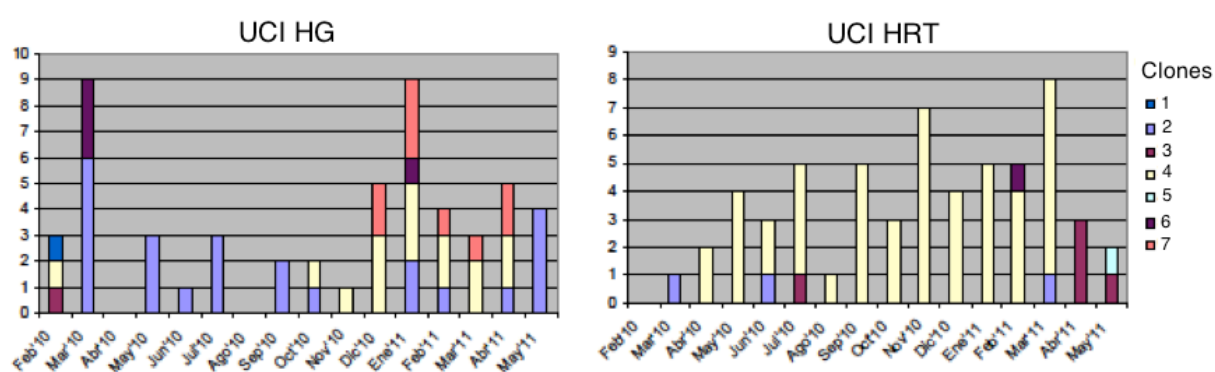


Gráfico 8. Distribución temporal y espacial de los distintos clones de *A. baumannii* según PFGE aislados.

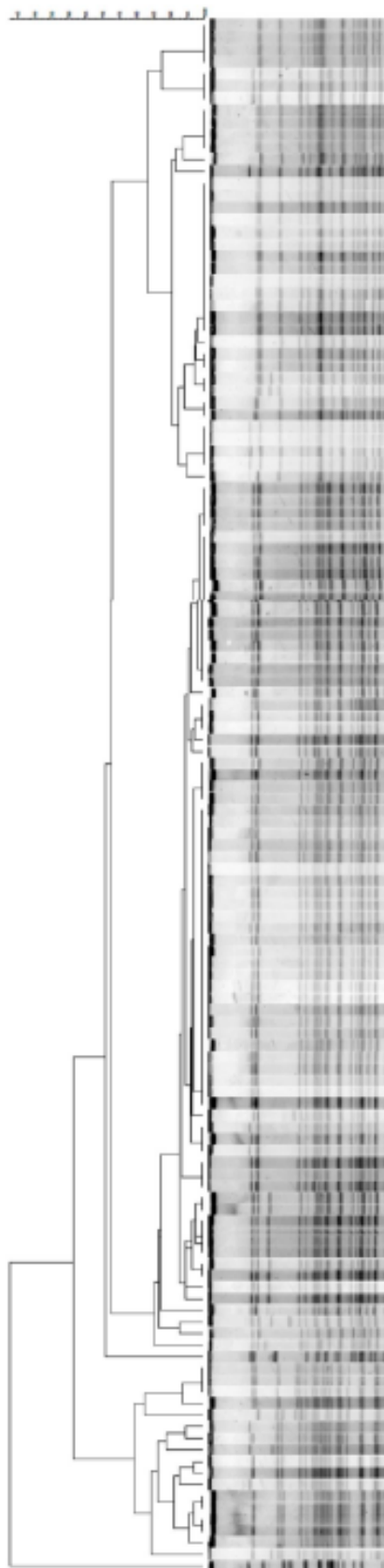


Figura 7. Dendrograma a partir de los resultados de PFGE.

5.2.2. Factores de virulencia.

5.2.2.1. Formación de *biofilm*. Distribución según la clonalidad y origen de las cepas.

El grado de producción de *biofilm* en las cepas pertenecientes a distintos clones por PFGE es el representado en el gráfico 9. Existe asociación estadísticamente significativa entre el clon y la producción de *biofilm* ($p < 0,001$); los aislados con una producción más elevada pertenecen a los clones 6 y 7.

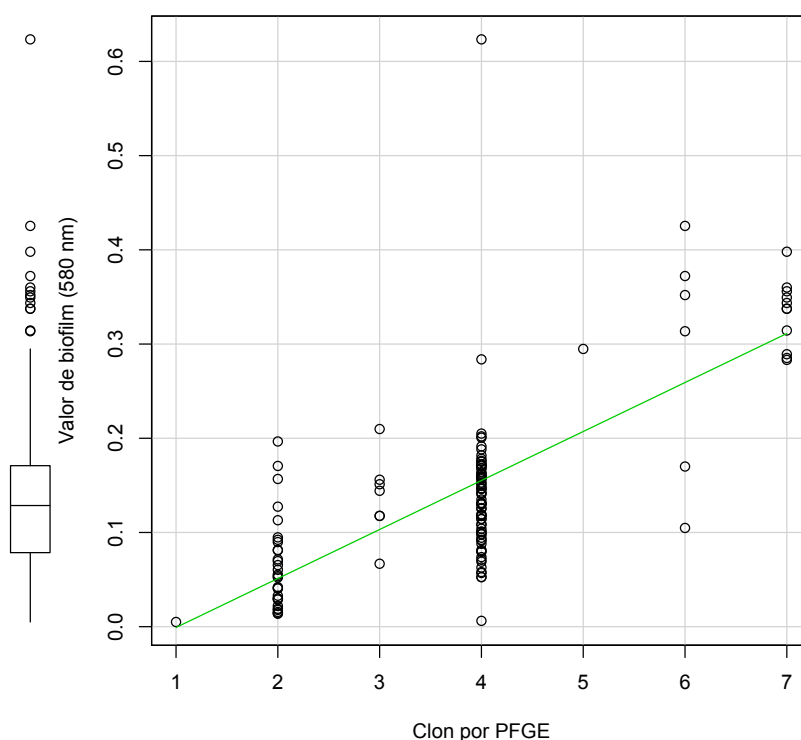


Gráfico 9. Distribución de la producción de *biofilm* por clones.

Diecisiete (13,5%) cepas procedentes de 15 pacientes pertenecían al fenotipo hiperproductor de *biofilm*. El resto de cepas fueron clasificadas como escasamente productoras de *biofilm*.

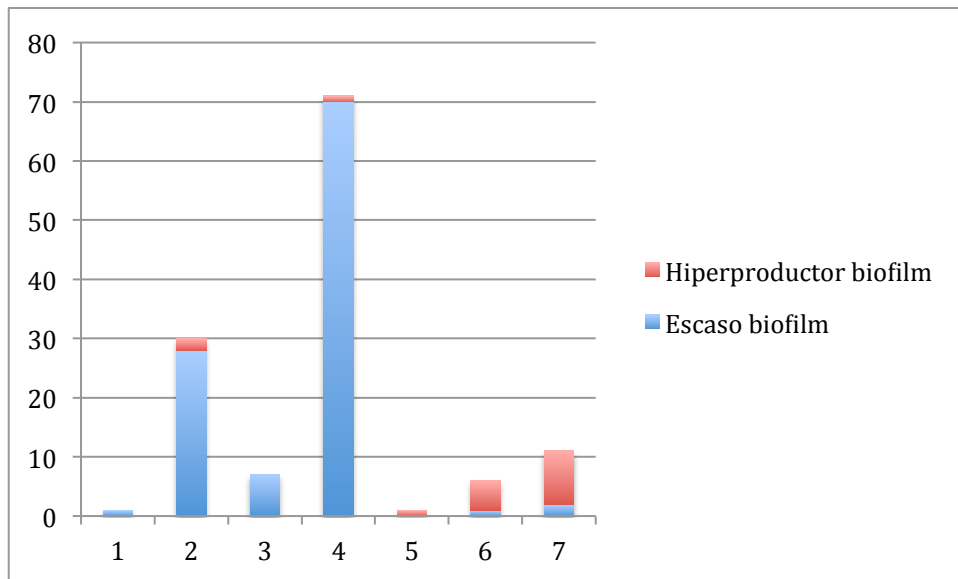


Gráfico 10. Distribución por clones del fenotipo de producción de *biofilm*.

No existieron diferencias significativas en la producción de *biofilm* entre las cepas procedentes de muestras de ATB y de hemocultivos ($p=0,44$). Tampoco se encontraron diferencias al ajustarlo por clones ($p=0,47$). En el gráfico 10 puede apreciarse la distribución.

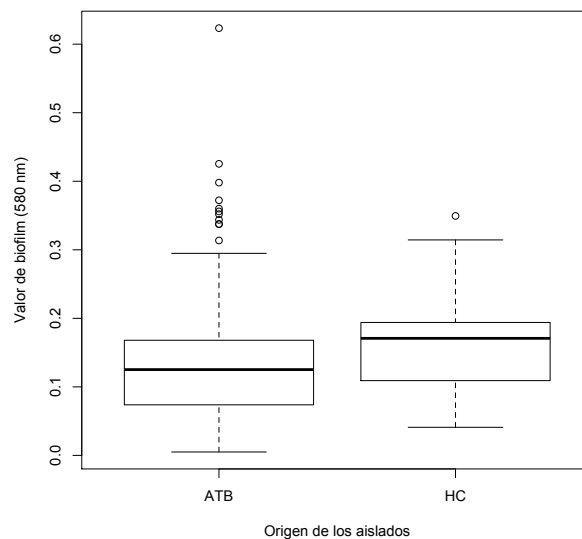
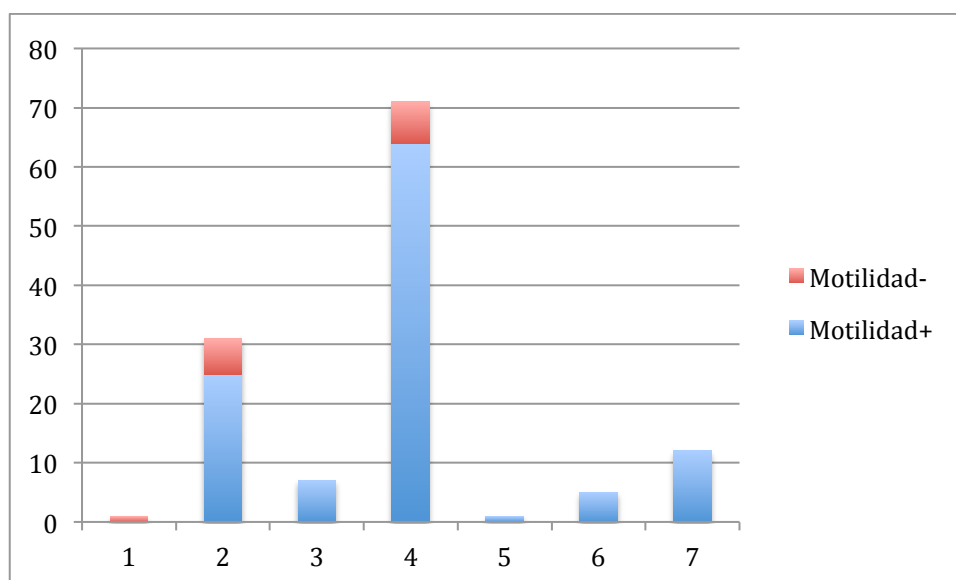


Gráfico 11. Distribución de la producción de *biofilm* según el tipo de muestra.

5.2.2.2. Motilidad en superficie. Distribución según la clonalidad y origen de las cepas.

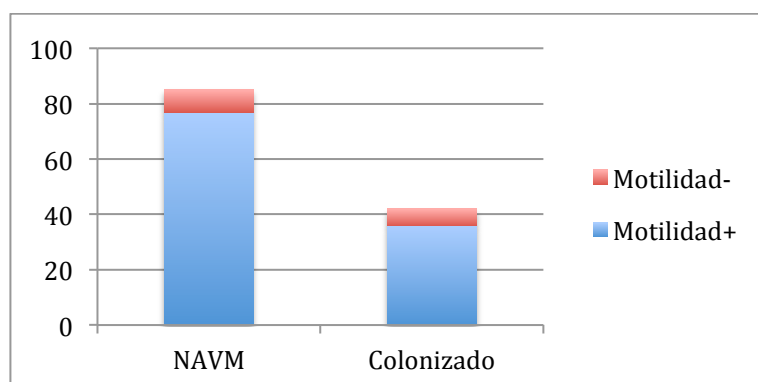
De las cepas estudiadas, solamente 14 (11,1%) no presentaban motilidad en superficie. Este fenotipo se agrupó en los clones 1 (1 aislado, 100%), 2 (6 aislados, 19,3%) y 4 (7 aislados, 11,4%) según se muestra en el Gráfico 12.

Gráfico 12. Distribución en los diferentes clones del fenotipo de motilidad.



La distribución de cepas con y sin motilidad fue similar entre los pacientes colonizados y los pacientes que desarrollaron NAVM ($p=0,667$), como se muestra en el Gráfico 13.

Gráfico 13. Motilidad de los aislados de *A. baumannii* en los pacientes colonizados o con NAVM.



5.2.2.3. Estudio de la producción de hemolisinas.

Ninguna de las cepas estudiadas presentaba producción de hemolisinas.

5.2.2.4. Capacidad de adquisición de hierro.

No existieron diferencias en la capacidad de adquirir hierro en las distintas cepas estudiadas, por lo que no se avanzó en el estudio de los factores de virulencia relacionados con la capacidad de adquisición del mismo.

5.2.2.5. Expresión de OmpA.

5.2.2.5.1. Elección de cepas.

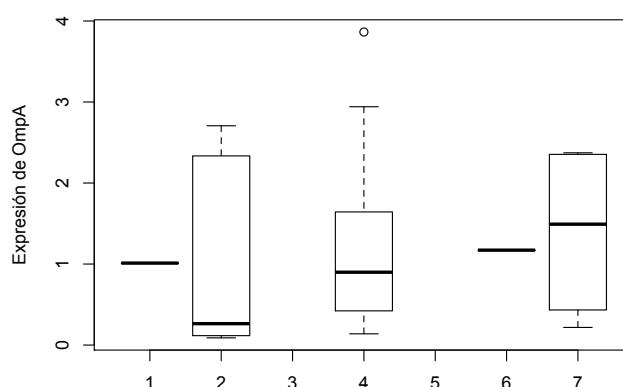
Para el estudio de la expresión de OmpA, se escogió un subgrupo de 29 cepas procedentes de muestra de ATB de 29 pacientes distintos: 16 procedentes de pacientes colonizados que no desarrollaron NAVM posteriormente y 13 procedentes de pacientes con NAVM que no habían estado previamente colonizados; de estos 13, 4 tenían una NAVM bacteriémica.

5.2.2.5.2. Expresión de OmpA según la clonalidad.

La mediana de expresión de *ompA* fue de 0,899 (0,331-1,73). La expresión en los diferentes clones aparece reflejada en la Figura 8, no presentando diferencias estadísticamente significativas ($p=0,9$).

Figura 8. Distribución de expresión de *ompA* en los distintos clones.

Clon	n	Expresión de <i>ompA</i>
1	1	1,01
2	6	0,26 (0,13-1,83)
4	17	0,89 (0,42-1,64)
6	1	1,17
7	4	1,49 (0,54-2,34)



5.2.2.5.3. Relación de la expresión de *OmpA* con otros factores de virulencia.

Seis (20,6%) de las cepas en las que se estudió la expresión de *ompA* tenían un fenotipo hiperproductor de *biofilm*. No existieron diferencias de expresión de *ompA* entre estas y las 23 (79,4%) restantes: 0,89 (0,36-1,67) vs. 0,91 (0,32-2,04) respectivamente ($p=0,85$). (Gráfico 14)

Dos (6,8%) de las cepas en las que se estudió la expresión de *ompA* no presentaban motilidad en superficie. La expresión de *ompA* fue similar en cepas con y sin motilidad: 0,89 (0,36-1,73) vs. 0,59 (0,38-0,8) respectivamente ($p=0,42$).

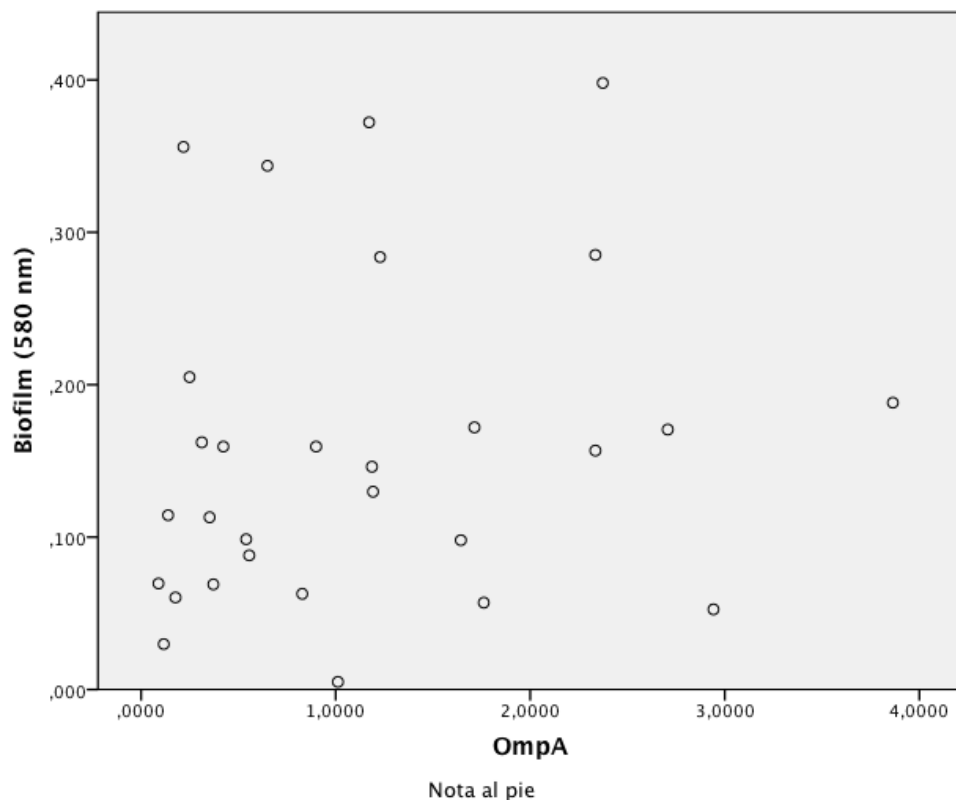


Gráfico 14. Correlación entre la expresión de *ompA* y producción de biofilm.

5.3. OBJETIVO 3. Evaluar la presencia de infección respiratoria, el desarrollo de bacteriemia y la mortalidad en los pacientes críticos con ventilación mecánica relacionados con la adquisición de cepas con distintos factores de virulencia bacteriana anteriormente caracterizados.

5.3.1. Relación de los factores de virulencia con el desarrollo de NAVM.

5.3.1.1. Relación de la formación de *biofilm* con el desarrollo de NAVM.

Siete (12,5%) cepas procedentes de ATB de pacientes colonizados, 9 (15,8%) procedentes de ATB de pacientes con NAVM y 2 (13,3%) procedentes de hemocultivos fueron hiperproductoras de *biofilm* ($p=0,87$) (Gráfico 15).

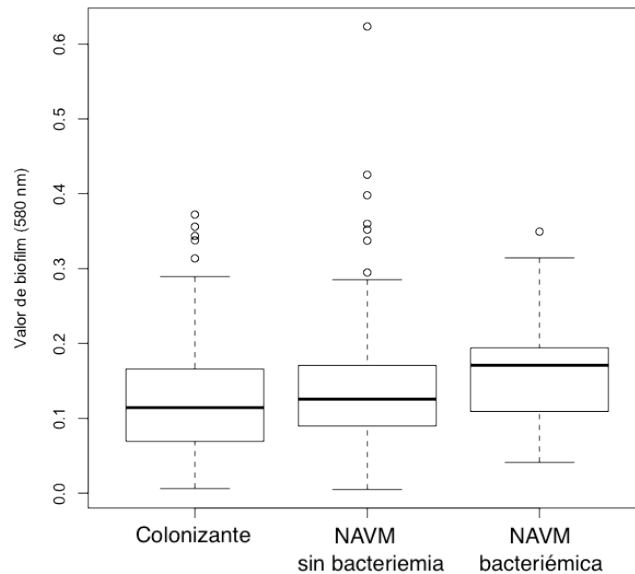


Gráfico 15. Distribución de la producción de *biofilm* según el origen de la muestra.

Entre los pacientes con NAVM, 10 (17,5%) tuvieron aislados hiperproductores de *biofilm*, frente a 6 (13,9%) de los pacientes que solo tuvieron colonización respiratoria ($p=0,59$). Tres de los pacientes con NAVM tuvieron bacteriemia y un aislado hiperproductora de *biofilm*, sin que ambos hecho presentaran asociación significativa.

5.3.1.2. Relación de la motilidad en superficie con el desarrollo de NAVM.

No se encontró asociación entre ningún fenotipo de motilidad y el desarrollo de NAVM. Ocho (13,5%) cepas procedentes de ATB de pacientes colonizados, 5 (9,2%) procedentes de ATB de pacientes con NAVM y 1 (6,6%) procedentes de hemocultivos no presentaban motilidad en superficie ($p=0,35$), el resto de cepas sí la presentaron.

Seis (10,5%) de los pacientes que desarrollaron NAVM y 6 (13,9%) de los pacientes colonizados tenían cepas sin motilidad ($p=0,35$).

5.3.1.3. Relación de la expresión de *ompA* con el desarrollo de NAVM y NAVM bacteriémica. Análisis bivalente y multivariante.

La expresión de *ompA* fue diferente en pacientes colonizados y pacientes con NAVM: 0,39 (0,2-0,69) vs. 1,64 (1,18-2,37); $p<0,001$ (Gráfico 16).

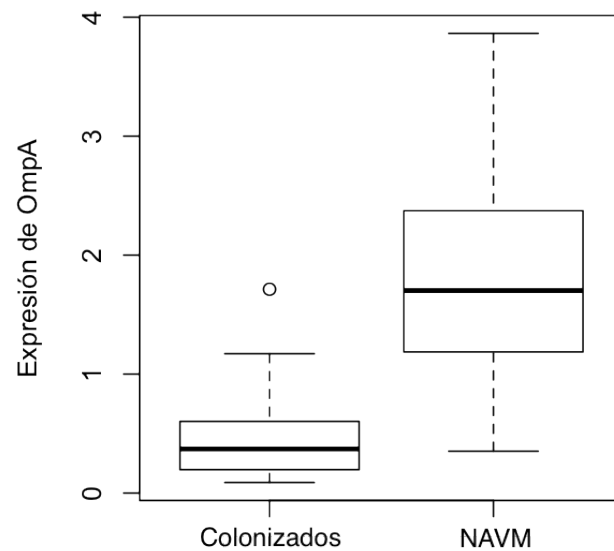


Gráfico 16. Distribución de la expresión de OmpA en pacientes colonizados o con NAVM.

La distribución fue diferente también entre pacientes con NAVM sin bacteriemia, con expresión mediana de 1,43 (1,4-1,9) y NAVM bacteriémica, con expresión mediana de 2,37 (2,33-2,94); $p<0,001$ (Gráfico 17).

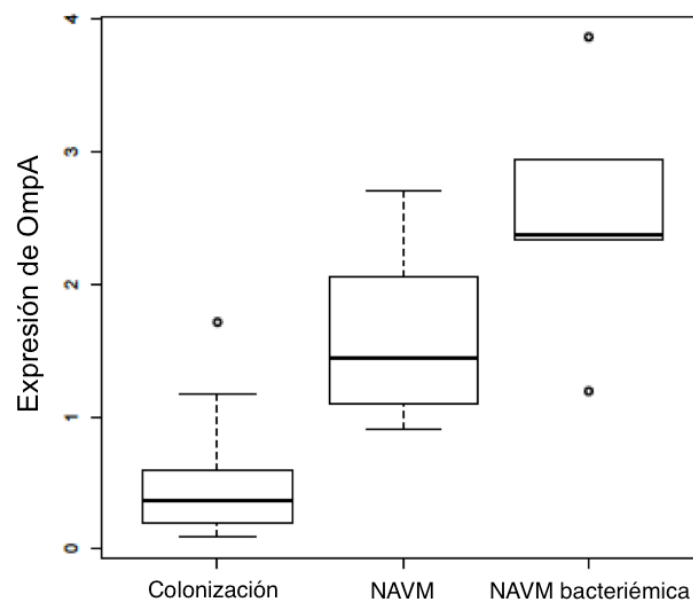


Gráfico 17. Distribución de la expresión de OmpA en pacientes colonizados, con NAVM no bacteriémica o con NAVM bacteriémica.

Tabla 25. Factores asociados con la expresión de OmpA. Análisis bivalente y multivalente.

	Bivalente	Multivalente	
	<i>p</i>	B (IC95%)	<i>p</i>
Clon ¹	0,980	-0,05 (-0,19 – 0,09)	0,459
Biofilm ²	0,332	-	-
Motilidad ¹	0,443	-	-
Diagnóstico* ¹	<0,001	1,063 (0,75-1,37)	<0,001

* Colonización, NAVM o NAVM bacteriémica.

1 Variables cualitativas

2 Variables cuantitativas

5.3.2. Relación de los factores de virulencia con la mortalidad.

La relación de los distintos factores de virulencia con la mortalidad solo se estudió en pacientes con NAVM.

5.3.2.1. Relación de la formación de biofilm con la mortalidad.

La producción de biofilm no se asoció con la mortalidad en el conjunto de la muestra, en el grupo de pacientes con colonización respiratoria ni en el conjunto de los pacientes con NAVM. El fenotipo hiperproductor de *biofilm* se asoció con la mortalidad ($p=0,044$) en el análisis bivalente en el subgrupo de pacientes con NAVM bacteriémica. Esta asociación no se encontró en la muestra global, en los pacientes con colonización respiratoria ni en el conjunto de pacientes con NAVM. (Gráfico 18) No obstante, esta asociación no alcanzó la significación estadística al comparar el valor de producción de biofilm entre supervivientes (0,10 [0,05-0,14]) y fallecidos (0,11 [0,07-0,28]) en el grupo de pacientes con NAVM bacteriémica ($p=0,283$).

Dado el reducido tamaño del grupo de pacientes con NAVM bacteriémica, no se pudo ajustar el valor de la producción de *biofilm* por otras variables relacionadas con la mortalidad en un análisis multivalente.

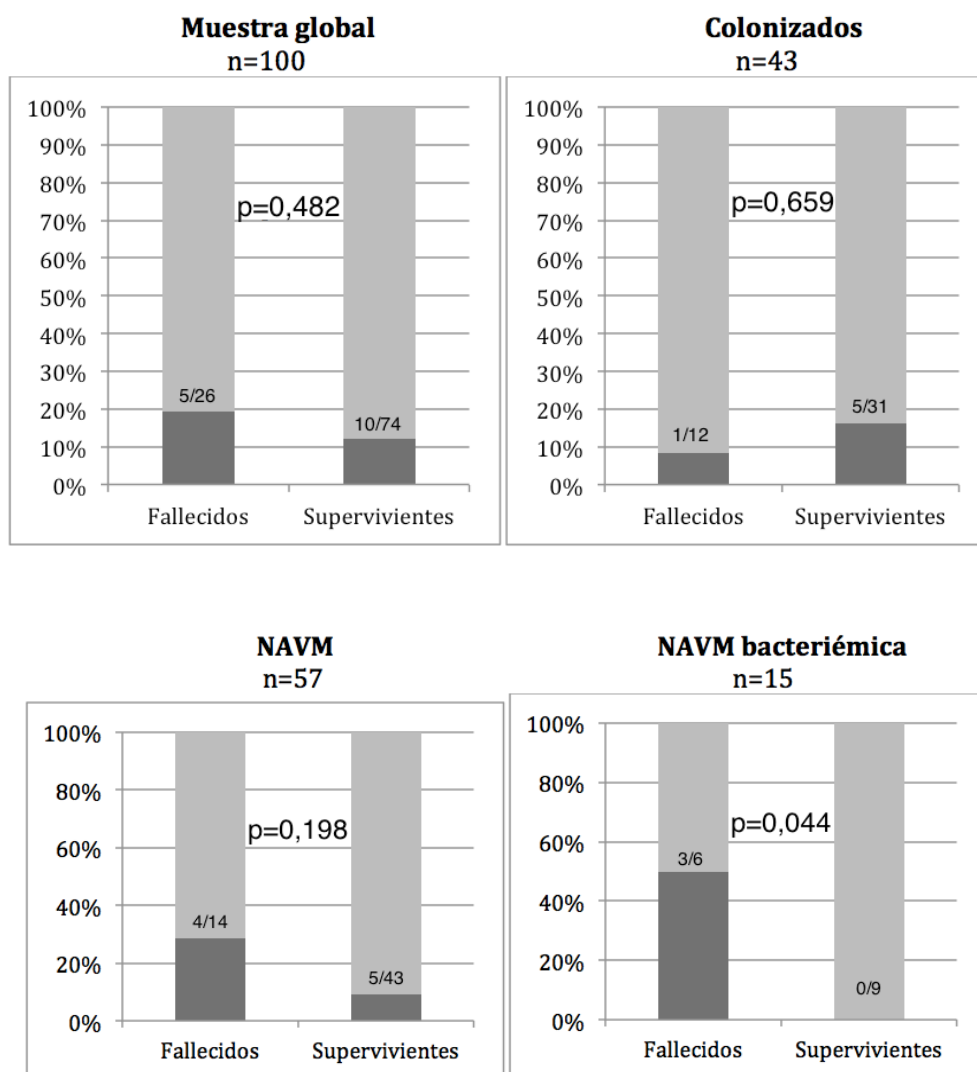


Gráfico 18. Asociación entre la producción de *biofilm* y la mortalidad en el conjunto global de los pacientes y en pacientes con colonización respiratoria, con NAVM o con NAVM bacteriémica.

5.3.2.2. Relación de la motilidad en superficie con la mortalidad.

El fenotipo de la motilidad en superficie no se asoció con la mortalidad en el conjunto de los pacientes ni tampoco en ninguno de los subgrupos (colonizados, pacientes con NAVM y pacientes con NAVM bacteriémica), como se observa en el gráfico 19.

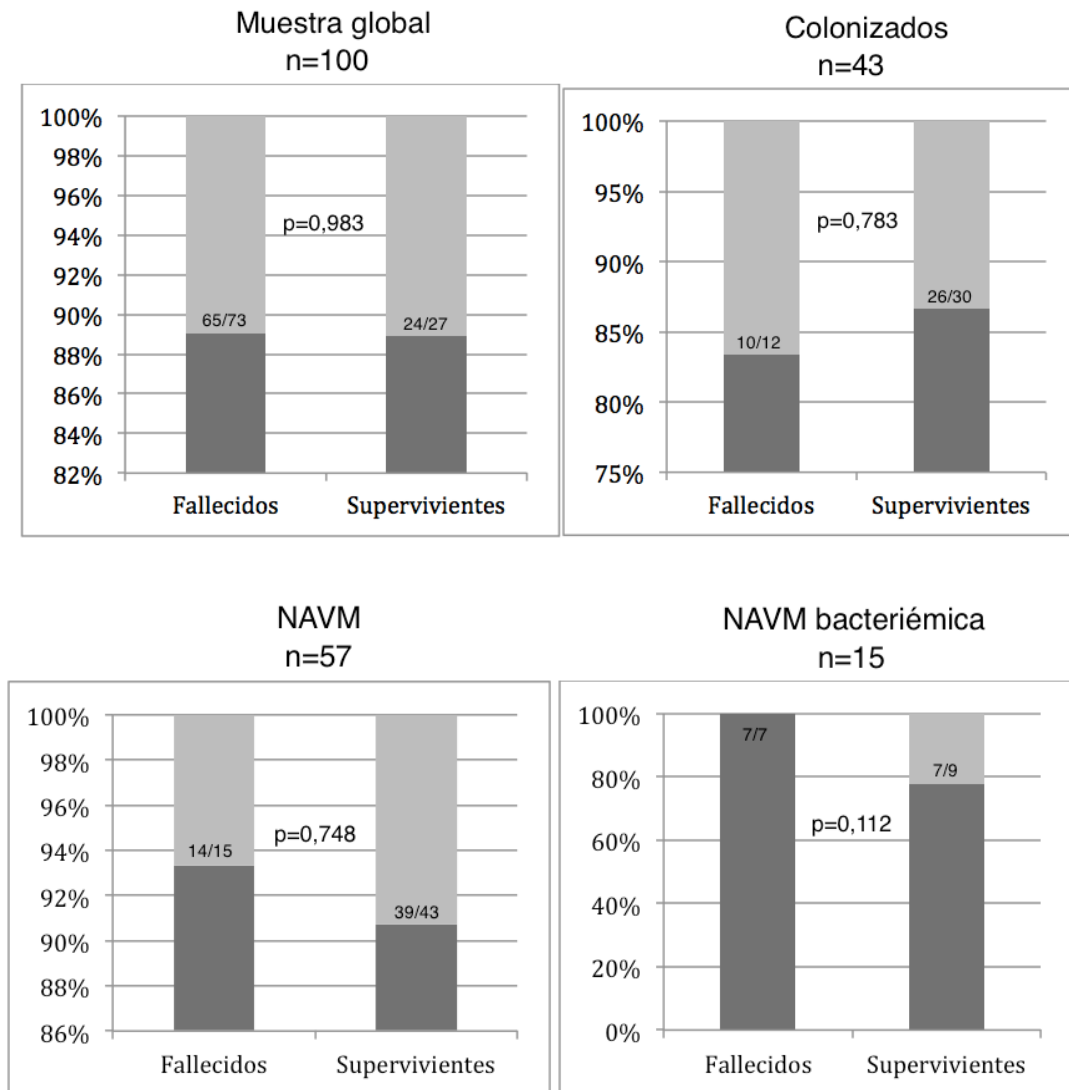


Gráfico 19. Asociación entre la motilidad de las cepas y la mortalidad en el conjunto global de los pacientes y en pacientes con colonización respiratoria, con NAVM o con NAVM bacteriémica.

5.3.2.3. Relación de la expresión de *ompA* con la mortalidad.

La expresión de *ompA* se relacionó con la mortalidad en los pacientes con NAVM, siendo de 2,37 (2,33-3,28) en los pacientes fallecidos (n=5) y de 1,21 (1,05-1,73) en los supervivientes (n=8), con un valor de $p=0,019$. (Gráfico 20)

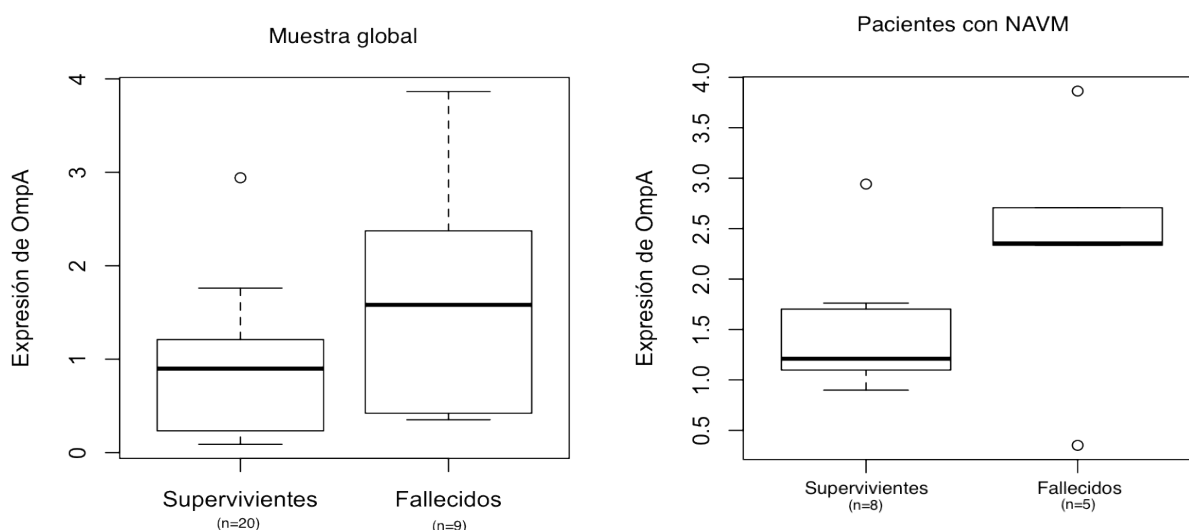


Gráfico 20. Distribución de la expresión de *ompA* en pacientes fallecidos o supervivientes en a) Muestra global, b) Pacientes con NAVM.

Esta asociación entre expresión de *ompA* y mortalidad permanecía en los pacientes con NAVM no bacteriémica ($p=0,004$) (Gráfico 21), mientras que en la NAVM bacteriémica se pierde dicha asociación ($p=0,45$) (Gráfico 22).

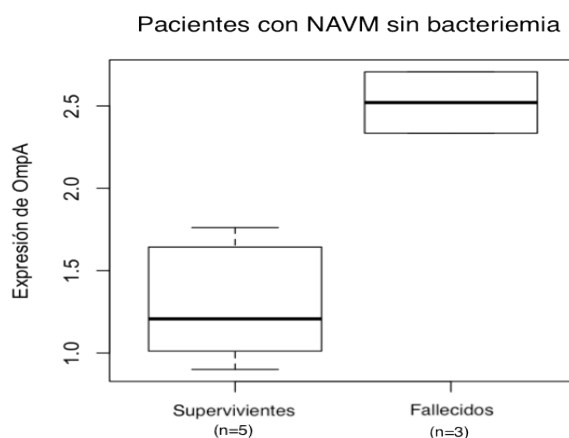


Gráfico 21. Distribución de la expresión de *ompA* en pacientes con NAVM sin bacteriemia fallecidos o supervivientes.

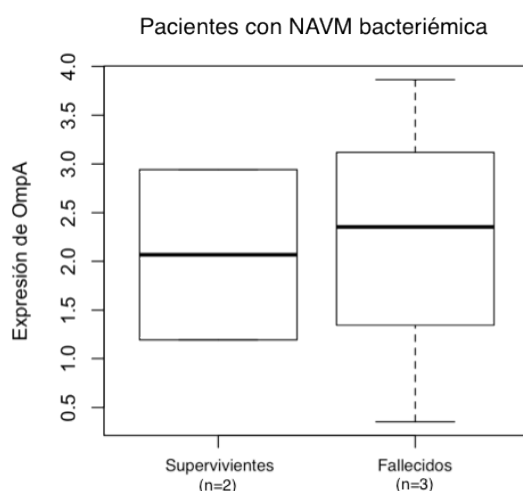


Gráfico 22. Distribución de la expresión de *ompA* en pacientes con NAVM bacteriémica fallecidos o supervivientes.

Se realizó un análisis multivariante ajustando por el índice de Charlson, al ser el factor más constantemente relacionado con la mortalidad en el conjunto de la muestra. Aunque en ningún caso (muestra global, grupo de pacientes con colonización respiratoria o grupo de pacientes con NAVM) la expresión de *ompA* llegó a demostrar relación estadísticamente significativa, su valor dentro del modelo varía respecto al índice de Charlson como predictor de mortalidad en pacientes colonizados o con NAVM (tablas 26-28).

Tabla 26. Factores relacionados con la mortalidad en la muestra global (análisis multivariante).

	p	OR (IC95%)
Índice de Charlson	0,028	3,55 (1,143-11,039)
Expresión de <i>ompA</i>	0,088	2,77 (0,858-8,985)
n=29		

Tabla 27. Factores relacionados con la mortalidad en pacientes con colonización respiratoria (análisis multivariante).

	p	OR (IC95%)
Índice de Charlson	0,062	7,11 (0,903-56,114)
Expresión de <i>ompA</i>	0,517	0,35 (0,015-8,220)
n=16		

Tabla 28. Factores relacionados con la mortalidad en pacientes con NAVM (análisis multivariante).

	p	OR (IC95%)
Índice de Charlson	0,303	4,37 (0,264-72,40)
Expresión de <i>ompA</i>	0,084	32,25 (0,62-1663,75)

n=13

5.4. OBJETIVO 4. Estudiar la asociación entre la presencia de mecanismos de resistencia a imipenem (baja expresión de porinas y presencia de carbapenemasas) y los factores de virulencia en la colección de cepas caracterizadas a partir del objetivo primero.

5.4.1. Mecanismos de resistencia a carbapenemas.

5.4.1.1. Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.

Las CMI y CMB de imipenem. amikacina. ceftazidima. ciprofloxacino. colistina. rifampicina. sulbactam y tigeciclina frente a los 126 aislados de *A. baumannii* seleccionados aparecen reflejadas en la Tabla 29.

En el estudio mediante Etest, todas las cepas fueron resistentes a meropenem, con un punto de corte superior a 8 mg/l (límite de detección de la técnica) excepto un aislado, que tuvo una CMI de 0,38 mg/l. (Figura 9).

Tabla 29. Sensibilidad *in vitro* de los aislados de *A. baumannii* elegidos para el estudio a los antibióticos seleccionados.

Antimicrobiano	Rango de CMI	CMI ₅₀	CMI ₉₀	CMB ₅₀	CMB ₉₀	% cepas sensibles
Imipenem	0,25-256	16	128	32	128	0,79
Meropenem	0,38->8	>8	>8	-	-	0,79
Amikacina	0,25-64	8	32	8	64	74,6
Ceftazidima	16-256	64	128	64	128	0
Ciprofloxacino	0,5	32	128	64	128	0
Colistina	0,06-0,12	0,06	0,12	0,06	0,12	100
Rifampicina	1-128	32	128	64	256	15,87
Sulbactam	2-64	4	16	8	32	58,73
Tigeciclina	0,06-0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	100

Imagen 1.

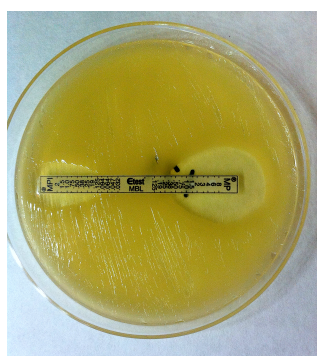


Imagen 2.

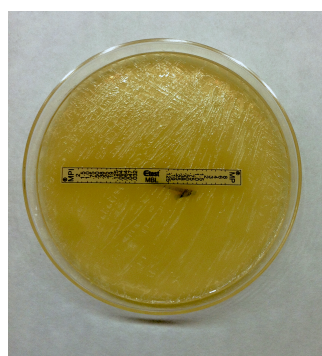


Figura 9. La imagen 1 muestra el resultado del Etest de la única cepa sensible a meropenem, con una CMI de 0,38 mg/l. La imagen 2 muestra el resultado de el resto de estudios que se realizaron, en los que se detectó una CMI superior a 8 mg/l.

5.4.1.2. Caracterización de carbapenemasas.

5.4.1.2.1. Presencia de carbapenemasas y relación con la CMI de imipenem. Distribución clonal.

En el estudio fenotípico mediante Etest MP/MPI, ningún aislado presentó criterios de presencia de MBL. En la PCR para determinación de oxacilinasas, todas las cepas contenían en gen de *blaOXA-51*, aunque solo en 11 (8,7%) estaba precedida por la secuencia *ISAbal1*. No se encontró ninguna cepa productora de *blaOXA-23* ni de las MBL IMP o VIM. La presencia de otras oxacilinasas (*blaOXA-40* y *blaOXA-58*) fue variable, como refleja la Tabla 30.

Tabla 30. Distribución clonal y CMI de imipenem de las cepas productoras de distintas carbapenemasas.

Carbapenemasa	CLON							Total	Imipenem		Meropenem
	1	2	3	4	5	6	7		CMI ₅₀	Rango	CMI ₅₀
<i>blaOXA-23</i>	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
<i>blaOXA-40</i>	1	-	3	2	-	4	11	21	128	8-256	>8
<i>blaOXA-58</i>	-	31	4	68	-	1	-	104	16	8-64	>8
<i>ISAbal –blaOXA-51</i>	-	-	-	1	-	3	7	11	128	8-256	>8
Ninguna	-	-	-	-	1	-	-	1	0,25	-	0,38
IMP	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-
VIM	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-

Tabla 31. Patrones de carbapenemasas y su relación con la CMI de imipenem.

Patrón de carbapenemasas	n	CMI ₅₀ imipenem
[OXA-58]- [OXA-40]- [ISAb ¹ OXA-51]-	1	0,25
[OXA-58]+ [OXA-40]- [ISAb ¹ OXA-51]-	103	16
[OXA-58]+ [OXA-40]- [ISAb ¹ OXA-51]+	1	32
[OXA-58]- [OXA-40]+ [ISAb ¹ OXA-51]-	11	64
[OXA-58]- [OXA-40]+ [ISAb ¹ OXA-51]+	10	128

La distribución de estos patrones fue desigual entre los distintos clones ($p < 0,001$), como puede observarse en el gráfico 23.

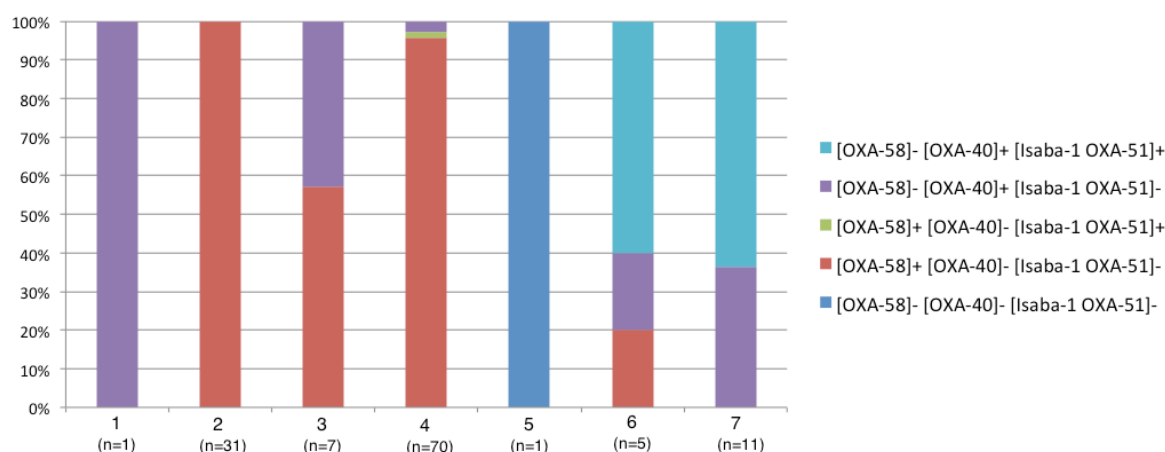


Gráfico 23. Distribución clonal de los distintos patrones de carbapenemasas.

Los aislados productores de *bla*OXA-58 presentaron valores CMI de imipenem significativamente inferiores a los aislados productores de *bla*OXA-40 ($p < 0,001$) (Gráfico 24). Dentro de los aislados productores de *bla*OXA-40, aquellos con *ISAb¹ OXA-51* tendían a tener valores superiores, sin que se encontraran diferencias estadísticamente significativas respecto a los aislados que no expresaban OXA-51 ($p = 0,113$) (Gráfico 25).

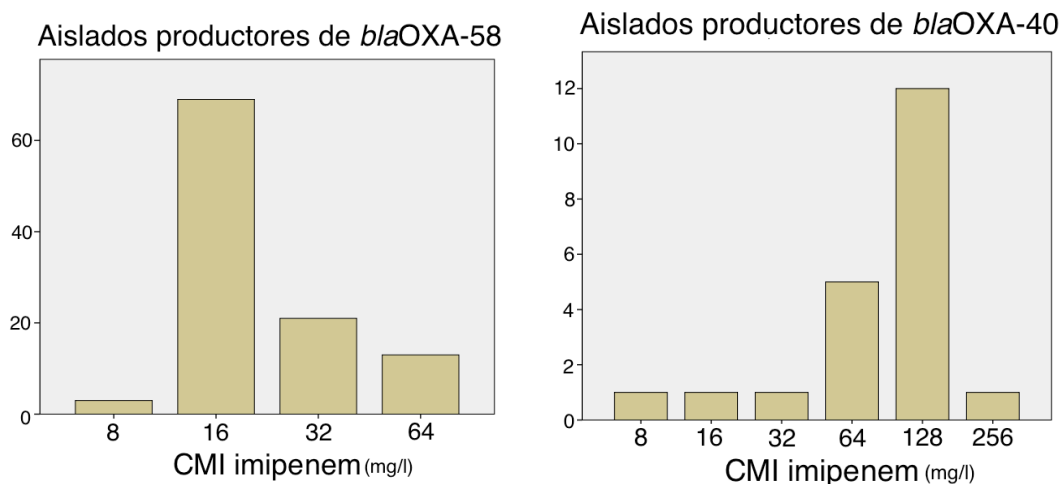


Gráfico 24. Distribución de la CMI de imipenem de las cepas productoras de *blaOXA-58* y de *blaOXA-40*.

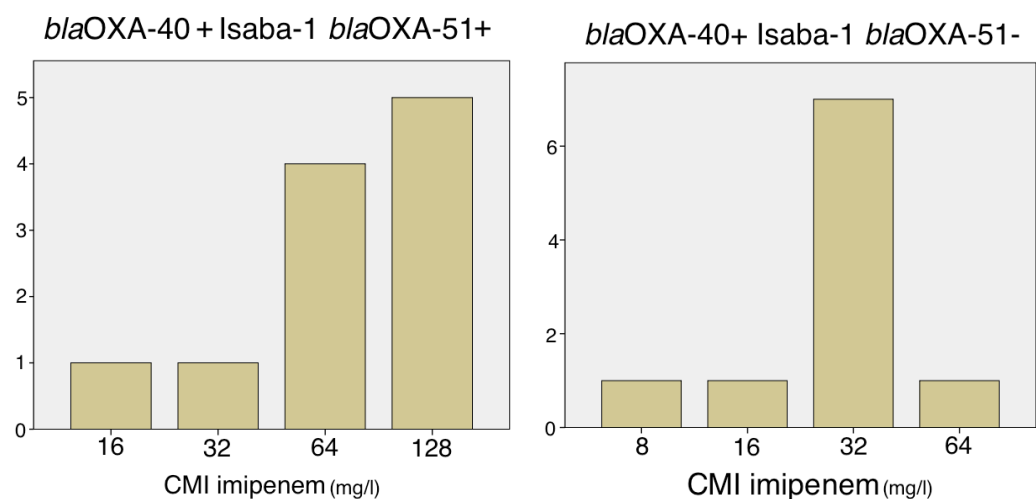


Gráfico 25. Distribución de la CMI de imipenem de las cepas productoras de *blaOXA-40* con y sin presencia de *ISAbal-blaOXA-51*.

5.4.1.3. Estudio de proteínas de membrana externa y expresión de porinas.

5.4.1.3.1. Caracterización de la producción de porinas y relación con la CMI de imipenem. Distribución clonal.

Entre el total de aislados estudiados, se encontraron 7 (5,5%) con una baja producción de una proteína de membrana con un peso molecular de unos 29 kDa, que corresponde al de la proteína de membrana CarO (Figura 10). Cinco de estas cepas presentaban una CMI de imipenem de 16 mg/l, todas ellas correspondían a cepas

portadoras de *bla*OXA-58, no existiendo diferencias en la CMI entre las cepas con baja producción de esta proteína y las que no la presentaban ($p=0,279$). Las dos cepas restantes correspondían a cepas portadoras de *bla*OXA-40. Tenían una CMI de imipenem de 64 mg/l y 128 mg/l respectivamente. Tampoco se encontraron diferencias respecto al resto de cepas con una expresión de CarO normal ($p=1,000$).

El fenotipo de baja producción de CarO estaba distribuido entre varios clones: dos pertenecían a clon 2, una al clon 3, tres pertenecían al clon 4 y uno al clon 7.

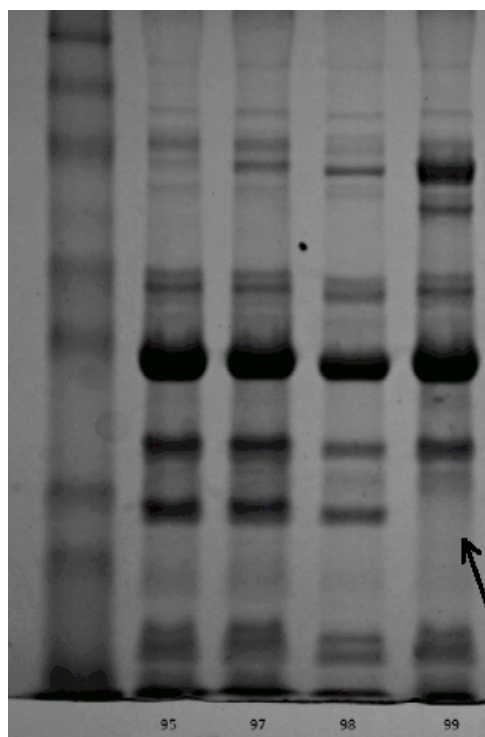


Figura 10. Resultado de electroforesis de proteínas de membrana externa de cuatro aislados. El cuarto, a diferencia de los demás, no tiene ninguna banda en el peso molecular correspondiente a 29KDa (punta de flecha).

5.4.1.4. Relación entre los mecanismos de resistencia y los factores de virulencia. Distribución clonal.

Se detectó una agrupación clonal de los fenotipos de producción de biofilm y de las carbapenemasas. Como puede verse en la Tabla 32, de 17 aislados hiperproductores de biofilm, 13 tenían *bla*OXA-40 y se agrupaban en los clones 6 y 7. En cambio, todos los aislados con *bla*OXA-58 menos 3 eran escasamente productores de biofilm, y la mayoría de ellos se agrupaban en los clones 2, 3 y 4. Las infecciones

producidas por estos últimos causaron una mortalidad del 21,3%, frente al 50% de las infecciones producidas por el primer grupo ($p=0,124$).

En los aislados en los que se determinó la expresión de *ompA*, la distribución clonal de su nivel de expresión, producción de biofilm, motilidad y carbapenemasas es el que muestra la tabla 33.

Tabla 32. Distribución clonal de las carbapenemasas, la producción de biofilm y la motilidad.

Carbapenemasas	Biofilm	Motilidad	Clon por PFGE							Total
			1	2	3	4	5	6	7	
[OXA-58]- [OXA-40]- [IS <i>Aba1</i> OXA-51]-	+	-	-	-	-	-	1	-	-	1
[OXA-58]+ [OXA-40]- [IS <i>Aba1</i> OXA-51]-	-	-	-	5	-	6	-	-	-	11
		+	-	27	4	61	-	1	-	89
	+	-	-	2	-	1	-	-	-	3
[OXA-58]+ [OXA-40]- [IS <i>Aba1</i> OXA-51]+	-	+	-	-	-	1	-	-	-	1
[OXA-58]- [OXA-40]+ [IS <i>Aba1</i> OXA-51]-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
		+	-	-	3	2	-	-	1	6
	+	+	-	-	-	-	-	1	3	4
[OXA-58]- [OXA-40]+ [IS <i>Aba1</i> OXA-51]+	-	+	-	-	-	-	-	-	1	1
	+	+	-	-	-	-	-	3	6	9
										126

Tabla 33. Distribución clonal de las carbapenemasas, la producción de biofilm, la motilidad y la expresión de *ompA* en los aislados en los que se realizó determinación de ésta.

Clon por PFGE	n	<i>ompA</i> NE*	Biofilm n	Motilidad n	Carbapenemasa	IS <i>Aba1</i> - <i>bla</i> _{OXA-51} n
1	6	0,96±1,21	1	5	<i>bla</i> _{OXA-58}	0
3	17	1,16±1,00	0	17	<i>bla</i> _{OXA-58}	0
5	1	1,17	1	1	<i>bla</i> _{OXA-40}	1
6	4	1,39±1,12	4	4	<i>bla</i> _{OXA-40}	3
7	1	1,01	0	0	<i>bla</i> _{OXA-40}	0

*NE: nivel de expresión (media ± desviación estándar)

VI. DISCUSIÓN.

6.1. OBJETIVO 1. Evaluar la mortalidad asociada a la colonización de vías respiratorias por *A. baumannii* vs. la de las infecciones respiratorias por esta bacteria, con o sin bacteriemia, en los pacientes críticos con ventilación mecánica.

6.1.1. Estudio epidemiológico. Descripción de la población de estudio.

Durante el periodo de estudio, se valoraron 412 pacientes con ventilación mecánica. Teniendo en cuenta el tamaño y la complejidad de la UCI, este número de individuos es inferior al esperado. En un estudio con 72 UCIs españolas, se estimó que la proporción de pacientes que ingresaban y recibían ventilación mecánica invasiva era del 29%. La duración mediana de esta fue de 4 (2-8) días (228). Aunque el porcentaje de pacientes intubados podría haber disminuido en los últimos años gracias al uso de ventilación no invasiva, el número esperado de pacientes a valorar durante el periodo(36) de estudio se encuentra cercano a 1000. Por tanto, los datos obtenidos deben ser interpretados desde este posible sesgo de selección.

La incidencia de adquisición de *A. baumannii* fue elevada: más de un tercio de los pacientes con ventilación mecánica durante más de 48 horas presentó cultivos positivos en aspirado traqueobronquial (ATB). Dicha cifra, junto con la precocidad de esta adquisición (el 75% se produjo en las primeras dos semanas), revela una elevada presión de colonización en el entorno de nuestra UCI, factor de riesgo de gran relevancia en la transmisión de *A. baumannii* (229)(230). Incidencias similares se han descrito en las UCIs de otros hospitales de nuestro entorno (43).

Cincuenta y siete de los pacientes incluidos desarrollaron una NAVM. Cuando se diseñó el estudio, la proporción esperada de incidencia de colonización y NAVM era 1:1. No obstante, esta proporción está basada en series que describen la distribución en colonización e infección de *A. baumannii* procedente de todo tipo de muestras biológicas (36).

6.1.1.1. Variables demográficas.

La proporción de hombres fue superior a la de mujeres en esta cohorte. Esta relación es similar a la descrita para el conjunto de pacientes con ventilación mecánica invasiva en UCIs españolas, al igual que la edad mediana (228). La distribución de estas variables entre pacientes colonizados o con NAVM se discute a continuación.

6.1.1.2. Características clínicas basales al ingreso en la UCI y complicaciones durante el ingreso.

Las características demográficas (edad y sexo) y clínicas (índices de Charlson y APACHE II) basales fueron similares en los pacientes que desarrollaron NAVM y los que permanecieron solo colonizados. Estos resultados son concordantes con lo que conocemos de series clínicas previas, en las que estas características no se comportan de forma estable como factores asociados al desarrollo de NAVM por *A. baumannii*. Solo la edad avanzada se ha descrito como factor de riesgo en algunos estudios, sin que se encontrase relación en otros (9)(231).

Los pacientes con NAVM desarrollaron con más frecuencia fracaso renal agudo durante el periodo de seguimiento, aunque la diferencia no alcanza la significación estadística. Esta tendencia podría estar en relación con la propia infección o con la eventual nefrotoxicidad del tratamiento antibiótico, que se hizo mayoritariamente con colistina, pero el diseño del estudio impide dilucidarlo. La frecuencia de shock séptico fue elevada, y similar, en ambos grupos. Aunque la NAVM es una posible causa de esta complicación, los pacientes críticos están especialmente expuestos a sufrirla por causas infecciosas diversas, lo cual explicaría la falta de diferencias.

La única variable que se distribuye de manera desigual en ambos grupos es la realización de una intervención quirúrgica. Esta asociación, no descrita previamente como factor de riesgo de NAVM, desaparece al realizar un análisis estratificado según el motivo de ingreso por causa médica, quirúrgica o traumatológica, ya que los pacientes pertenecientes a las dos últimas categorías, que agruparon todos los casos de cirugía durante el periodo de seguimiento, tuvieron una incidencia superior de NAVM por *A. baumannii* que aquellos ingresados por una patología médica. Esta diferencia no alcanza la significación estadística en las categorías de ingreso por patología médica, quirúrgica o traumatológica. El tipo de intervenciones quirúrgicas fue tan heterogéneo que, con nuestro tamaño muestral, hace difícil atribuir a esta categoría el papel de factor de riesgo de NAVM por *A. baumannii*, en ausencia de experiencia previa que lo avale.

Los motivos de ingreso en UCI fueron bastante variados, reflejando la diversidad de pacientes atendidos en este centro. El politraumatismo constituyó la causa más frecuente de ingreso (19%), seguida por la neumonía comunitaria (15%). No existieron diferencias en la distribución de estas categorías entre pacientes con colonización por *A. baumannii* y los que desarrollaron NAVM, salvo el caso de los pacientes con traumatismo craneoencefálico: los cinco pacientes que se incluyeron desarrollaron NAVM.

La duración de la ventilación mecánica invasiva es un factor de riesgo conocido de adquisición de *A. baumannii* y de desarrollo de NAVM (229)(232). En esta cohorte, la duración fue más prolongada que en otras series (229), pero no se encontraron diferencias significativas entre colonizados y pacientes con NAVM. La extubación precoz es un factor protector de desarrollo de NAVM, y está recomendada como medida preventiva de la misma (233).

La densidad de incidencia de NAVM por *A. baumannii* en los pacientes incluidos en el estudio fue de 28,5 casos/1000 días de ventilación mecánica. En nuestro entorno, la incidencia global de NAVM se encuentra en torno a 15 episodios/1000 días de ventilación, según los datos recabados en más de 100 UCIs españolas de 2000 a 2009 por el Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial (ENVIN) (234). Esta cifra sigue siendo elevada en comparación con otros países: en Estados Unidos, el sistema de vigilancia nacional *United States National Healthcare Safety Network* reportó una tasa de incidencia de 3,7 casos por cada 1000 días de ventilación mecánica en 2006-2008 (235). Por este motivo, se han desarrollado iniciativas en nuestro país destinadas a reducir la incidencia de NAVM, como el proyecto “Neumonía-Zero”, cuyo objetivo es alcanzar una tasa por debajo de 9 casos de NAVM/1000 días de ventilación mecánica en nuestro país (233). Los resultados de nuestro estudio, con una tasa de NAVM por *A. baumannii* que duplica la media nacional de NAVM por cualquier causa, sugieren que la adquisición de *A. baumannii* en la vía respiratoria podría elevar notablemente la posibilidad de desarrollar esta infección, pero su diseño impide afirmarlo, ya que desconocemos la incidencia global de NAVM por cualquier causa durante el mismo periodo.

La adquisición de bacterias MDR, incluyendo la de *A. baumannii*, se ha considerado un factor de riesgo de incremento de infecciones nosocomiales. Esta afirmación se basa fundamentalmente en estudios de casos y controles (236)(237). Sin embargo, en algunos, como el realizado por Playford *et al.* (230), la incidencia de infección nosocomial no fue superior en el grupo de pacientes con *A. baumannii* que en los controles. En dicho estudio, que no describe específicamente cuántas de las infecciones eran NAVM, los factores de riesgo asociados al desarrollo de infección por *A. baumannii* fueron la densidad de colonización, descrita como la ratio entre el número de muestras positivas para *A. baumannii* respecto a las muestras solicitadas, y las transfusiones de sangre.

Son escasos los estudios de seguimiento en los que se parte de la colonización por *A. baumannii*, se observa cuántos pacientes desarrollan infección clínica y se

analizan los factores asociados a ello. Diseños diferentes a este impiden que la incidencia se describa en forma de tasa, como es NAVM/1000 días de ventilación mecánica, que al ajustar por los días en riesgo, permite analizar con más precisión las diferencias entre grupos que la incidencia acumulada. El estudio de cohortes más importante realizado al respecto es reciente (238). En él se analizó la aparición de infección clínica por *A. baumannii* en pacientes ingresados en una UCI a los que se les habían realizado cultivos de vigilancia. Los pacientes con aislamiento de *A. baumannii* en dichos cultivos tenían un riesgo 8,4 veces superior de padecer una infección clínica por este microorganismo, el 47% de las cuales fueron NAVM, que aquellos con cultivos negativos. Las muestras utilizadas para los cultivos de vigilancia habían sido frotis rectales o secreciones respiratorias, pero el artículo no revela si los que desarrollaron neumonía habían tenido cultivos positivos en muestras respiratorias, frotis rectal o ambos.

6.1.1.3. Tratamiento antimicrobiano.

El consumo de antimicrobianos previo a la adquisición de *A. baumannii* fue muy elevado, tanto en pacientes colonizados como en pacientes con NAVM. Sin embargo, cualitativamente existieron diferencias en el patrón de prescripción de ambos grupos: los pacientes con NAVM recibieron con más frecuencia tratamiento con β -lactámicos de amplio espectro (cefepima, piperacilina-tazobactam y carbapenemas) y con vancomicina, mientras que los colonizados recibieron más levofloxacino. La UCI es una de las áreas del hospital donde se produce un mayor consumo de antimicrobianos y éste constituye uno de los factores de riesgo clave para la adquisición de microorganismos MDR, incluyendo *A. baumannii* (43)(9)(38). El uso previo de carbapenemas es un factor de riesgo muy relevante y ampliamente reflejado en la literatura para la adquisición de *A. baumannii* resistente a carbapenemas (239)(240). Sin embargo, no hemos encontrado ningún estudio en el que se compare específicamente el consumo de antimicrobianos entre pacientes con infección y colonización por este microorganismo. Nuestros resultados sugieren que el consumo previo de antibioterapia de amplio espectro, especialmente carbapenemas, no sólo aumenta la probabilidad de adquirir *A. baumannii* por selección de cepas resistentes, sino la probabilidad de padecer una infección por el mismo. La patogenia de este efecto estaría por aclarar. Una posible explicación sería que algunos factores de virulencia se sobreexpresen o se seleccionen en presencia de antibióticos de amplio espectro, como sabemos que ocurre con la producción de biofilm en medio con

concentraciones subinhibitorias de imipenem (241) o la expresión de *ompA* en presencia de meropenem (200).

La mayoría de los pacientes con NAVM recibió tratamiento con colistina intravenosa a dosis de 2 MU cada 8 horas. En el apartado de resultados 5.4.4.1. se muestra la sensibilidad de los aislados estudiados, en la que se puede apreciar que la totalidad de ellos eran susceptibles a colistina y prácticamente todos, resistentes a carbapenemas. Colistina ha emergido como herramienta terapéutica, tras muchos años de desuso, debido a la situación epidemiológica de bacilos gramnegativos, con *A. baumannii* a la cabeza, en los que no existe otra opción válida de tratamiento. Sin embargo, la dosis óptima está por definir, ya que la estándar (2 MU/8 h) parece ser insuficiente a tenor de los resultados de múltiples estudios farmacocinéticos (104)(103). Los aislados de *A. baumannii* obtenidos en este estudio fueron extraordinariamente sensibles a colistina, con una CMI₉₀ de 0,12 mg/l. Esta circunstancia explicaría la eficacia del tratamiento.

6.1.1.4. Aspectos microbiológicos.

6.1.1.4.1. Concentración bacteriana.

La mayoría de los aislados de *A. baumannii* presentó una concentración elevada, superior a 6 log₁₀ UFC/ml. Aunque unos pocos casos de colonización tuvieron valores inferiores, los resultados muestran una clara similitud en la concentración bacteriana en ATB entre pacientes colonizados o con NAVM por *A. baumannii*, que también fue similar entre diferentes clones. Entre los pacientes colonizados, tanto los que permanecieron en dicho estado como los que desarrollaron ulteriormente una NAVM por *A. baumannii*, la carga bacteriana fue elevada desde la primera muestra, no existiendo diferencias entre ellos ni una concentración a partir de la cual se pudiera predecir el desarrollo de NAVM. La carga bacteriana fue similar en todos los clones incluidos. Por consiguiente, estos resultados sugieren que *A. baumannii* tiene la capacidad de colonizar con elevada carga bacteriana la vía respiratoria de los pacientes ventilados, y que por tanto dicha carga no es útil para diferenciar entre infección y colonización.

En el diagnóstico microbiológico de la NAVM continúan siendo motivo de controversia la validez de los distintos tipos de muestra y la utilidad de los cultivos cuantitativos. Fundamentalmente, existen dos clases de estrategias diagnósticas

opuestas: la estrategia “no invasiva” o “clínica”, basada en cultivos de secreciones traqueales, habitualmente cualitativos; y la “invasiva”, fundamentada en el uso de cultivos cuantitativos de muestras obtenidas del tracto respiratorio inferior, habitualmente mediante broncoscopia. Una revisión sistemática publicada por la Cochrane Collaboration encontró que la estrategia clínica no era inferior a la invasiva en lo que respecta al pronóstico clínico de la NAVM (242). No obstante, algunos autores consideran que las técnicas invasivas con cultivos cuantitativos presentan ventajas en lo que respecta a mayor grado de confianza del clínico en los resultados, a la contribución al uso racional de antimicrobianos y a un valor predictivo negativo, y las recomiendan como prueba estándar para el diagnóstico de NAVM, tanto con fines clínicos como de vigilancia epidemiológica (243). Otros, en cambio, afirman que esta recomendación no está suficientemente avalada por la literatura ni exenta de problemas (244). El principal es la falta de reproducibilidad de los métodos, tanto en la toma de las muestras (en la concentración del LBA pueden influir factores como la cantidad de suero instilado, el área pulmonar explorada o la exposición a antimicrobianos), como en el procesamiento de la mismas.

El aspirado de secreciones endotraqueales es un procedimiento más sencillo que la toma de muestras invasivas, lo que motiva que muchos clínicos continúen eligiéndolo. El umbral de concentración en esta muestra para el diagnóstico de NAVM se encuentra en 5-6 \log_{10} UFC/ml. Esta cifra procede de varios estudios bastante heterogéneos en su selección de pacientes y en sus criterios diagnósticos de NAVM (245). La correlación entre la concentración de ATB y la de LBA no está suficientemente aclarada. Berdal *et al.* (246) llevaron a cabo un estudio de seguimiento que analizó la dinámica de colonización respiratoria en pacientes ventilados con varias muestras consecutivas de frotis faríngeo, ATB y LBA. Estos autores detectaron una elevada correlación en los microorganismos encontrados en las tres localizaciones, hasta el punto de que si un patógeno respiratorio no estaba presente en la faringe, tampoco lo estaba en el LBA. Sin embargo, no aportan la concentración bacteriana en ATB, por lo que no es posible correlacionarla con la del LBA. Cabe destacar que, en este estudio, no hubo asociación entre el aislamiento de patógenos en LBA con una concentración $\geq 4 \log_{10}$ UFC/ml y la presencia o no de infiltrado radiológico compatible con una NAVM.

En nuestro estudio, no existió relación entre la exposición a antibioterapia y la concentración bacteriana. Esta relación sí se ha puesto de manifiesto en estudios previos, como el mencionado de Berdal *et al.* (246), en el que se detectó que los

pacientes que estaban recibiendo antibioterapia presentaban cultivos positivos por encima de 4 log₁₀ UFC/ml con una frecuencia muy inferior a la de aquellos sin tratamiento antimicrobiano (OR 0,31 [IC95% 0,11-0,91]). Este estudio no menciona si la concentración bacteriana en ATB presentó un comportamiento similar. Es plausible que la elevada concentración bacteriana en las muestras de nuestro estudio esté en relación con la presencia de material extraño (tubo endotraqueal), habida cuenta de que este proporciona una superficie sobre la que los patógenos pueden formar biopelícula, siendo un factor de riesgo conocido de persistencia de colonización, si bien su efecto sobre la concentración bacteriana no está bien descrito (247).

En nuestro caso, menos del 25% de las muestras con *A. baumannii* presentaba una carga bacteriana inferior a 6 log₁₀ UFC/ml. Desde la primera muestra con *A. baumannii*, la mayoría de los pacientes ya presentaban una carga elevada. La colonización es, fisiopatológicamente, el paso previo a la infección. Buen ejemplo de ello en infecciones por *A. baumannii* es el estudio de Latibeaudiere *et al.* (238) mencionado previamente, que demostró relación entre el desarrollo de infección clínica y la colonización previa por *A. baumannii*. Sin embargo, en dicho estudio se diagnosticó la colonización mediante cultivos cualitativos, lo cual impide saber si la concentración bacteriana aumentó progresivamente hasta alcanzar un inóculo capaz de producir infección, o bien el desarrollo de esta depende de otros factores.

El fenómeno de la elevada concentración bacteriana no se puede atribuir a una característica clonal, ya que las distintas clonas estudiadas presentaban un comportamiento similar.

6.1.1.5.2. Otros aislamientos microbiológicos.

Además de *A. baumannii*, aproximadamente la mitad de los pacientes incluidos presentaron múltiples aislamientos microbiológicos, en ATB y/o en sangre, durante el seguimiento. El significado clínico de estos aislamientos es variable. Algunos forman parte del motivo de ingreso (como *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes* o *N. meningitidis*). La mayoría, en cambio, aparecen durante el transcurso de la estancia en UCI y, especialmente los procedentes de ATB, son reflejo de la presión antibiótica. Entre ellos hay 7 aislamientos en ATB de *Candida* spp., 2 de *P. acnes* y 2 de estafilococos coagulasa-negativo (SCN), que no tienen un papel patogénico en vías respiratorias bajas, aunque sí lo tengan aislamientos equivalentes en hemocultivos (15 bacteriemias por SCN y 3 candidemias). En cambio, también hay otros con una notable importancia como patógenos nosocomiales, como *S. aureus* (12 aislamientos

en ATB y 4 en hemocultivos), *P. aeruginosa* (14 aislamientos en ATB) y múltiples enterobacterias (17 aislamientos en ATB y 7 en sangre). El impacto que cada uno de estos aislamientos ha tenido sobre el pronóstico de los pacientes es difícil de conocer con los datos de los que disponemos.

No obstante la diversidad de aislamientos microbiológicos, *A. baumannii* es el que predomina durante todo el seguimiento, apareciendo en más del 50% de los cultivos de ATB desde la primera muestra tomada a los pacientes. Estos resultados reflejan la importante presión de colonización existente en las áreas estudiadas. Se considera habitualmente que *A. baumannii* es un patógeno que causa NAVM tardía (248). Sin embargo, en esta cohorte, algunos pacientes tuvieron NAVM causada por *A. baumannii* al tercer día de ventilación mecánica.

6.1.1.6. Evolución clínica y pronóstico.

6.1.1.6.1. Mortalidad.

En nuestra cohorte, la mortalidad de los pacientes con NAVM por *A. baumannii* fue del 24,6%. Esta cifra es inferior a la descrita en la mayor parte de estudios al respecto, tanto para la NAVM de cualquier etiología como para la causada por *A. baumannii*, para la que se describe una mortalidad cruda que oscila entre 34,5 y 84% (232)(249)(60)(54)(65)(250)(59)(251)(46). La mortalidad de los pacientes colonizados fue similar a la de los pacientes con NAVM: 27,9% ($p=0,7$), al igual que los resultados del análisis de supervivencia entre ambos grupos ($p=0,34$).

Existen pocos estudios que hayan comparado el pronóstico de la NAVM por *A. baumannii* respecto a la colonización respiratoria. Con un diseño similar al de este estudio, Zhuo *et al.* (252) describieron una mayor mortalidad en pacientes colonizados con un elevada carga bacteriana por *P. aeruginosa* que en aquellos con una NAVM producida por el mismo patógeno con menos concentración bacteriana en ATB, con una HR=. La explicación a este fenómeno no es fácil de dilucidar, ya que los pacientes no presentan diferencias clínicas significativas en otros parámetros con posible valor pronóstico (comorbilidades previas, diagnóstico al ingreso, gravedad clínica, complicaciones durante la estancia en UCI). Esto plantea la cuestión de que la colonización con elevado inóculo por bacilos gramnegativos no fermentadores pueda ser deletérea *per se* para pacientes con ventilación mecánica, aun no produciendo neumonía. Los autores sostienen la hipótesis de que ello sea secundario a la adquisición de cepas más virulentas, basándose en los niveles elevados de la toxina

de *P. aeruginosa* PcrV. Las principales limitaciones de este estudio son el reducido tamaño muestral, que le permite una potencia de solo el 56%, y que no tiene en cuenta algunas situaciones clínicas que explicarían los resultados, como la posibilidad de una infección grave por *P. aeruginosa* de localización distinta a la respiratoria o datos de deterioro inmunológico que explicarían tanto la facilidad de *P. aeruginosa* para proliferar como la mayor mortalidad. Los resultados de nuestro estudio no sugieren un papel patogénico de la colonización de alto inóculo, a pesar de que la mortalidad sea similar en pacientes colonizados y con NAVM. En primer lugar, no hemos detectado relación entre la concentración bacteriana de los pacientes colonizados y la mortalidad. En segundo lugar, lo que observamos no es un incremento de mortalidad en los pacientes colonizados, sino, como señalábamos antes, una mortalidad cruda de la NAVM por *A. baumannii* inferior a la descrita en otros estudios.

Numerosos autores han estudiado el impacto de *A. baumannii* sobre la mortalidad de pacientes con NAVM (249)(60)(251)(46). Kollef *et al.*(251) identificaron a los bacilos gramnegativos no fermentadores, incluyendo casos de *A. baumannii*, como una etiología de alto riesgo, pero no analizaron separadamente a cada una de las especies. En una cohorte de 163 pacientes con NAVM se describió a *A. baumannii* como un factor de riesgo independiente de mortalidad (OR 3,3 [IC95% 1,12-9,7]), llegando a alcanzar una mortalidad cruda del 61%(60). Mao *et al.*(249) encontraron que la NAVM producida por *A. baumannii* tenía una mortalidad superior a la producida por otros patógenos. No obstante, en un 15,4% de los controles de este estudio, los microorganismos aislados fueron *Candida* spp. y estafilococos coagulasa-negativo, que no tienen un rol patogénico en vías respiratorias inferiores. Un estudio con 60 casos (pacientes con NAVM producida por *A. baumannii*) y 60 controles apareados (entre los que se encontraban pacientes con NAVM causada por otros microorganismos y pacientes sin NAVM) no encontró diferencias de mortalidad cruda entre casos y controles. Sin embargo, se realizó un sub-análisis que reveló diferencias significativas de mortalidad entre aquellos casos con NAVM producida por *A. baumannii* resistente a carbapenemas y sus controles apareados (44% vs. 24%)(46). La heterogeneidad de resultados en cuanto a mortalidad de la NAVM por *A. baumannii* podría estar explicada por una distribución desigual de los factores de riesgo entre diferentes muestras de pacientes, como se discutirá más adelante.

6.1.1.6.2. Estancia en UCI y estancia hospitalaria.

La NAVM por *A. baumannii* fue uno de los factores que se relacionaron de manera independiente con una estancia en UCI más prolongada. Este es un efecto conocido del conjunto de las infecciones nosocomiales (44). No obstante, estudios previos han mostrado que las infecciones por *A. baumannii* se relacionan con una mayor estancia en UCI que otras infecciones nosocomiales (60).

6.1.2. Factores relacionados con la mortalidad y estancia en UCI.

6.1.2.1. Factores relacionados con la mortalidad. Análisis bivariante y multivariante.

Los factores relacionados con la mortalidad fueron la presencia de una situación basal deteriorada (medida con el índice de Charlson) y las complicaciones graves durante el ingreso (shock séptico o fracaso renal agudo), tanto en el global de la muestra como en los pacientes colonizados o con NAVM analizados separadamente. Estas son variables que se relacionan habitualmente con mal pronóstico en pacientes críticos, con o sin NAVM (60). Ello subraya la elevada complejidad de los pacientes atendidos en la UCI, con factores heterogéneos que influyen su pronóstico y dificultan la interpretación del verdadero impacto de la NAVM sobre la mortalidad.

Aunque no llegó a seleccionarse como factor independiente, en el análisis bivariante se observa que los pacientes con un motivo de ingreso traumatológico menor mortalidad que los ingresados por otra causa, tanto en pacientes colonizados como infectados. Estos resultados son concordantes con un estudio multicéntrico realizado en 27 UCIs europeas, en el que la mortalidad de la NAVM en pacientes traumatológicos fue inferior a la de pacientes ingresados en UCI por otro motivo (42,6% vs. 17,2%)(253). Aunque achacarse esta diferencia a la menor edad y escasa comorbilidad que suelen presentar estos pacientes, cabe destacar que en el estudio mencionado se conservaba la diferencia tras ajustar por sexo, edad y gravedad al ingreso en UCI (253).

En los pacientes con NAVM, además de los referidos, observamos dos factores con un impacto relevante sobre el pronóstico: la presencia de bacteriemia por *A. baumannii* y el tratamiento apropiado. Este último solo aparece como factor protector en el modelo de Cox.

El tratamiento apropiado es un factor pronóstico clave común todas las infecciones graves cuyo impacto también se ha demostrado en la NAVM producida por

A. baumannii (254). Un meta-análisis que incluyó 24.186 pacientes procedentes de 44 estudios observacionales (255) encontró que la NAVM se asociaba a mayor mortalidad (OR 1,96 [IC95% 1,26-3,04]) que los grupos con los que se comparaba. Esta asociación, sin embargo, no se produjo en el subgrupo de pacientes con tratamiento inicial correcto. La elevada mortalidad descrita en los pacientes infectados por cepas más resistentes se relaciona probablemente con la menor probabilidad de recibir tratamiento apropiado (60)(46)(57). Por este motivo, a pesar del elevado nivel de resistencia de los aislados incluidos en este estudio, la elevada proporción de pacientes que recibieron tratamiento apropiado y la baja CMI de colistina de las cepas estudiadas, han contribuido a una tasa de mortalidad cruda inferior a la descrita en estudios previos para pacientes con NAVM producida por *A. baumannii* resistente a carbapenemas (46)(60). Probablemente, la causa de la elevada proporción de pacientes con tratamiento apropiado haya que buscarla en el conocimiento de la ecología local por parte de los clínicos, ya que en pocos pacientes se podían basar en cultivos de colonización previos.

El tratamiento utilizado de manera generalizada para tratar a estos pacientes fue colistina en forma de colistimetato sódico (CMS) a dosis de 2 MU cada 8 horas, que es la recogida en la ficha técnica del fármaco. Esta dosis no está sustentada por estudios de farmacocinética y farmacodinámica (PK/PD) como los requeridos en la actualidad para lanzar un antibiótico al mercado. Estudios PK/PD poblacionales han mostrado que una dosis de CMS de 2 MU cada 8 horas tardaría 48 horas en alcanzar una concentración plasmática de 2 mg/l, que es la CMI hasta la que se considera sensible a *A. baumannii* (103)(256). Sin embargo, estos mismos estudios muestran que con una sola dosis de 2 MU se alcanzan niveles plasmáticos por encima de 0,5 mg/l. Por tanto, es probable que la eficacia clínica de colistina que observamos en nuestra cohorte esté motivada por la extrema sensibilidad de las cepas incluidas (CMI₉₀=0,25 mg/l).

La correlación entre CMI de colistina y eficacia no ha sido puesta de manifiesto en estudios clínicos. La mayoría de los que han testado la efectividad de colistina en infecciones producidas por *A. baumannii* no describen la CMI de los aislados, o lo hacen de manera agregada (91)(257)(258)(259). El estudio que aporta más datos al respecto es el estudio observacional llevado a cabo por Markou *et al.* (260), en el que se analiza la respuesta clínica de infecciones graves (NAVM o bacteriemia) por bacilos gramnegativos tratadas con colistina 3 MU cada 8 horas. De 10 pacientes con infecciones por *A. baumannii*, 7 alcanzaron la curación clínica: 6 de ellos tenían un

aislado de *A. baumannii* con una CMI $\leq 0,5$ mg/l y uno tenía una CMI =2 mg/l, pero era también sensible a meropenem y fue tratado concomitantemente con este fármaco. De los que fallaron, dos tenían una CMI=1 mg/l y uno, un valor de CMI $\leq 0,5$ mg/l. Este último fue tratado simultáneamente con cinco fármacos, lo que hace suponer que el fallo pudiera estar explicado por una infección concomitante y/o una situación clínica crítica.

La bacteriemia se presenta como un factor de riesgo de mortalidad relevante. Su efecto se aprecia mejor en el análisis de supervivencia, alcanzando un HR ajustado de 4,67. Tal y como este valor y la gráfica de supervivencia reflejan, los pacientes con bacteriemia fallecen más y más precozmente que los que no la presentan. Se puede considerar que la presencia de bacteriemia concomitante a la NAVM alerta de la invasividad y gravedad de la neumonía. La relación entre neumonía bacteriémica y mortalidad está sostenida por datos profusos en la literatura (261)(262), al igual que la elevada mortalidad cruda de la bacteriemia por *A. baumannii*, que oscila entre el 19% (en una cohorte que incluía pacientes críticos y no críticos)(51) y el 70% (262)(263)(66)(67)(68)(72)(69)(264). En nuestra cohorte, los pacientes con bacteriemia por *A. baumannii* presentaron una mortalidad cruda del 40%. El factor que más regularmente se relaciona con la mortalidad de la bacteriemia por *A. baumannii* es el tratamiento inapropiado (67)(72)(69).

6.1.2.2. Factores relacionados con la estancia en UCI. Análisis bivariante y multivariante.

La NAVM por *A. baumannii* fue el factor más sólidamente relacionado con la estancia en UCI. Al desglosar por grupos (pacientes con NAVM o colonizados), se obtienen factores diversos como predictores de la estancia, lo cual aporta una idea de la variedad de factores que pueden influir en dicha estancia y refuerzan la importancia de que la NAVM por *A. baumannii* sea uno de ellos. Esto es especialmente importante teniendo en cuenta que no se ha ajustado por otras posibles infecciones nosocomiales que tuvieran los pacientes incluidos durante su ingreso. En estudios previos, se han descrito múltiples factores como predictores de estancia prolongada en UCI, que pueden agruparse fundamentalmente en cuatro: situación basal (edad y comorbilidades), situación al ingreso (tipo de patología y gravedad clínica), tipo de tratamientos y soporte utilizados, y complicaciones durante la estancia en la UCI (265)(266). Dentro del último grupo, las infecciones nosocomiales ocupan un lugar destacado como factores que prolongan la estancia en UCI (60), habiéndose

demostrado este efecto también para el caso particular de las infecciones por *A. baumannii* (267).

En resumen, en pacientes críticos con ventilación mecánica invasiva que adquirieron *A. baumannii* en las vías respiratorias bajas es frecuente el desarrollo de NAVM, alcanzando el 57% en nuestra cohorte en 30 días de seguimiento. Los pacientes que desarrollaron NAVM tuvieron la misma mortalidad que los pacientes que sólo estuvieron colonizados, siendo una mortalidad inferior a la generalmente descrita para pacientes con NAVM por *A. baumannii* MDR. Sin embargo, aquellos pacientes con una NAVM bacteriémica presentaron mayor mortalidad que los que no tuvieron bacteriemia, sugiriendo que el nivel de invasividad de la neumonía determina su pronóstico. El tratamiento antibiótico correcto con colistina, a pesar de haberse utilizado dosis inferiores a las que actualmente se recomiendan, mejoró significativamente la supervivencia de los pacientes con NAVM. Esta elevada tasa de tratamiento apropiado justificaría la incidencia de mortalidad observada.

La NAVM por *A. baumannii* fue el principal factor de riesgo para una estancia en UCI prolongada.

6.2. OBJETIVO 2. Comparar la presencia de determinados factores de virulencia entre las cepas clínicas colonizantes y productoras de infección: formación de *biofilm*, motilidad, expresión de *ompA*, adquisición de hierro y presencia de hemolisinas.

6.2.1. Relación clonal de las cepas.

La REP-PCR clasificó a todos los aislados menos dos en un mismo clon, mientras que al utilizar PFGE, se hallaron 7 pulsotipos diferentes. El poder discriminativo y la concordancia de resultados entre ambas técnicas es variable, según estudios previos (268)(269). En nuestra cohorte, la mayor parte de los aislados, correspondientes a 5 pulsotipos, fueron clasificados como “clon A” por la REP-PCR, revelando el mayor poder discriminativo de PFGE aplicado a esta cohorte.

Los estudios de clonalidad son muy útiles para analizar el comportamiento de los brotes de bacterias nosocomiales, y encontrar las posibles fuentes y vías de transmisión, así como para establecer la asociación entre características microbianas (como los mecanismos de resistencia o de virulencia) y la relación entre distintas

cepas. Dentro de los estudios de tipado, existen dos grandes grupos: los fenotípicos y los genotípicos o moleculares. Estos últimos son más estables, reproducibles y poseen mayor poder discriminativo que los fenotípicos, por lo que constituyen los métodos de referencia (62). Existen diversas técnicas de genotipado basadas en el estudio del ADN cromosómico, que se diferencian en su reproductibilidad, cobertura del genoma y poder discriminativo (270). Las dos técnicas utilizadas en este estudio, REP-PCR y PFGE, tienen bases metodológicas diferentes. REP-PCR se basa en la amplificación y posterior análisis de secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (271). PFGE está basado en la digestión con endonucleasas y posterior electroforesis de los fragmentos de restricción en campo pulsante, una electroforesis que permite separar mejor los fragmentos de DNA, especialmente aquellos más grandes, respecto a la convencional (272). Ambas técnicas son útiles en el estudio de brotes nosocomiales, con ventajas diferentes: PFGE posee un mayor poder discriminativo, mientras que REP-PCR es una técnica más rápida y barata (270). Ninguna de las dos permite comparar los resultados con los de otros laboratorios o averiguar el clon al que pertenecen. Para ello habría que usar *multilocus sequence typing* (MLST), cuyo poder discriminativo en cambio es escaso, o secuenciación masiva, que es la técnica más completa (reproducible, exportable, discriminativa) pero muy costosa en tiempo y recursos (270). Además, existen técnicas de tipado de elementos móviles (por ejemplo, plásmidos) que permiten estudiar las vías de transmisión de algunos mecanismos de resistencia, factores de virulencia u otras características entre distintos aislados. En esta cohorte no se realizaron estudios de clonalidad que permitan conocer a qué clon internacional pertenecen los aislados estudiados. En España el clon internacional preponderante es el II (ST2 por MLST), como muestra un estudio nacional en el que participó nuestro hospital, sin que tengamos información acerca de los resultados concretos de los aislados locales (273).

La determinación de la clonalidad de estas cepas permite conocer mejor el comportamiento epidemiológico de *A. baumannii* en nuestro centro. La distribución de las distintas áreas que conforman la UCI del Hospital Virgen del Rocío explica, en parte, la distribución espacial y temporal de los aislados con distintos pulsotipos que muestra el Gráfico 8. Existen dos áreas claramente diferenciadas, la UCI-HG y la UCI-HRT, que están situadas en edificios diferentes y rara vez comparten personal o dispositivos, o se transfieren pacientes. En la UCI HG predomina durante todo el periodo de estudio el clon 2, con nuevos casos incidentes casi todos los meses. Este clon aparece puntualmente, de forma dispersa en el tiempo, en la UCI HRT,

probablemente en relación a traslados de pacientes. A partir del 11º mes de seguimiento, aparece el clon 7, produciendo varios casos exclusivamente en esta unidad. En la UCI HRT predomina durante todo el periodo el clon 4, que hacia la mitad del periodo de seguimiento se transfiere a la UCI HG, donde convive con otros clones. Los clones 3 y 6 aparecen de manera dispersa en el tiempo y el espacio, por lo que es probable que procedan de reservorios ambientales persistentes que colonizan ocasionalmente a los pacientes. Los clones 1 y 5 son dos cepas pertenecientes a casos únicos. Al encontrarse ambas en los extremos temporales del periodo de seguimiento, desconocemos si eran verdaderamente casos esporádicos, o brotes de los que no tenemos más información. Esta situación epidemiológica es similar a la descrita en otros hospitales, en los que conviven clones endémicos, epidémicos y esporádicos (30).

6.2.2. Factores de virulencia.

6.2.2.1. Formación de *biofilm*. Distribución según la clonalidad y origen de las cepas.

La formación de *biofilm* fue desigual entre aislados pertenecientes a diferentes clones, agrupándose la mayoría de aislados con fenotipo hiperproductor de *biofilm* en los clones 6 y 7, a pesar de que eran clones con pocos representantes. En cambio, no se encontró relación entre la producción de *biofilm* y la procedencia (sangre o ATB) de los aislados. Estos resultados concuerdan con los proporcionados por de Breij *et al.* (152), que vieron una gran variabilidad en la producción de *biofilm* entre distintos aislados de *A. baumannii*, encontrando que esta se relacionaba con la clonalidad pero no con la muestra de la que procedía el aislado. En cambio, otros autores han detectado que aquellas cepas procedentes de muestras de tejidos normalmente estériles (sangre, líquido cefalorraquídeo) tenían una capacidad superior de producir *biofilm* a la de aislados procedentes de muestras superficiales, como úlceras (274).

La producción de *biofilm* es un factor de patogenicidad y virulencia común a muchas especies bacterianas, que les confiere la capacidad de persistir adheridas a una superficie biológica y/o inerte y reduce la sensibilidad a los antimicrobianos. A pesar de sus diferencias, la mayoría de los aislados incluidos producían *biofilm* en mayor o menor grado. En todos los pacientes de nuestro estudio existía un dispositivo con superficies plásticas: el tubo endotraqueal. Ello, junto con la anulación del reflejo de la tos y de la capacidad de eliminar las secreciones bronquiales, constituye el principal factor de riesgo de neumonía nosocomial que tienen los pacientes con

ventilación mecánica. Es probable que la capacidad de producir biofilm sobre el tubo endotraqueal haya contribuido a la colonización y a la persistencia de *A. baumannii* en muestras respiratorias incluso después de finalizar un tratamiento antibiótico correcto para tratar a los pacientes con NAVM.

No debe confundirse la capacidad de producir biofilm sobre superficies inertes con la de adherirse a células eucariotas. Ambas capacidades pueden no ser paralelas, como se mostraba en el estudio realizado por de Breij *et al.* (152) Estos autores también describieron que *A. baumannii*, a pesar de su adherencia a las células de epitelios respiratorios humanos, induce una respuesta inflamatoria pobre en las mismas, así como en los macrófagos (escasa producción de TNF α e interleuquinas). Esta podría ser la explicación a la persistencia de *A. baumannii* en la vía aérea de los pacientes que lo adquieren, incluso tras retirar el material extraño.

6.2.2.2. Motilidad en superficie. Distribución según la clonalidad y origen de las cepas.

La mayoría de los aislados estudiados presentaba motilidad en superficie. El fenotipo no móvil se agrupaba en un 11,1% de las cepas distribuidas en tres pulsotipos, no existiendo diferencias en su distribución en función de si procedían de pacientes colonizados o con infección, ni tampoco de si se habían aislado en muestras de sangre o ATB.

En algunos estudios realizados con colecciones de aislados clínicos de *A. baumannii*, se observa una proporción elevada de aislados con motilidad positiva (182). En otros, en cambio, es menos prevalente (275) o incluso muy infrecuente (276). No obstante, la motilidad es un fenotipo bastante lábil: pequeños cambios en las condiciones de humedad, temperatura o composición del medio pueden arrojar resultados muy dispares (184)(154)(172). Ello hace poco comparables los resultados de estudios distintos.

6.2.2.3. Estudio de la producción de hemolisinas.

Ninguno de los aislados estudiados mostró capacidad hemolítica. Hasta donde sabemos, no hay estudios publicados en los que se haya testado la producción de hemólisis de *A. baumannii* en medio con eritrocitos humanos. Sin embargo, nuestros resultados son coherentes con lo encontrado en la mayoría de estudios al respecto: a pesar de que las cepas de *A. baumannii* secuenciadas hasta la fecha contienen genes relacionados con hemolisinas, la capacidad hemolítica se ha descrito de manera

infrecuente en aislados de esta especie, a diferencia de otras dentro del género *Acinetobacter*, como *A. haemolyticus* and *A. venetianus* (277). No obstante, la capacidad de producir hemólisis podría ser, al menos en parte, huésped-dependiente, según se deriva de los resultados de Antunes *et al.* (184) que muestran cómo cepas de *A. baumannii* que no provocan hemólisis en medios con eritrocitos de carnero sí lo hacen en medios con eritrocitos de caballo.

6.2.2.4. Capacidad de adquisición de hierro.

No se detectaron diferencias significativas entre aislados en la capacidad de crecer en medios con distintas concentraciones de hierro. En estudios previos, dicha capacidad se relacionaba de manera directa con la producción de moléculas reguladoras de la capacidad de quelar y adquirir hierro del medio (184). Por este motivo, decidimos no profundizar en la búsqueda de factores de virulencia relacionados con esta capacidad.

6.2.2.5. Expresión de OmpA.

6.2.2.5.1. Expresión de OmpA según la clonalidad.

La expresión de *ompA* no presentó diferencias significativas entre los distintos clones, a pesar de que las medianas de expresión de cada grupo clonal presentan un rango amplio entre sí (de 0,26 a 1,49), probablemente motivado porque dicha amplitud también se cumple dentro de cada clon. Este comportamiento hace suponer que son otros factores, distintos de la relación clonal de las cepas, los que han llevado a que se produzcan niveles distintos de expresión.

Aunque sus mecanismos reguladores no han sido aun bien descritos, sabemos que la expresión de *ompA* se ve influenciada por diversos factores ambientales. Uno de ellos es el tratamiento antibiótico. En el estudio realizado por He *et al.* (200) la presencia de antibióticos a dosis subinhibitorias tuvo efectos diferentes en la expresión de *ompA*: mientras que levofloxacin se relacionaba con un aumento de la expresión de *ompA*, meropenem se asoció con un descenso de dicha expresión.

6.2.2.5.3. Relación de la expresión de OmpA con otros factores de virulencia.

En esta muestra, la expresión de *ompA* no se relacionó con la formación de biofilm ni con la motilidad de los aislados. Estos resultados contrastan con otros

previamente reportados, que reflejan la estrecha relación entre la producción de OmpA y la de biofilm (200)(167). Los mecanismos por los que se produce esta relación no están aclarados, postulándose que pueda tener relación con la capacidad emulsificadora de OmpA segregada al medio (200)(278). No obstante, según se mostró en un estudio realizado mediante *insertional mutagenesis*, el papel de OmpA en la adhesión y formación de biofilm sobre superficies plásticas es solo parcial. En cambio, su presencia fue imprescindible para la adhesión y formación de biofilm sobre células eucariotas (filamentos de *Candida albicans* y células de epitelio alveolar humano)(167).

La relación entre expresión de *ompA* y motilidad en *A. baumannii* no ha sido estudiada en profundidad, hasta donde sabemos.

En resumen, los aislados analizados en este estudio se agruparon en 7 pulsotipos diferentes, existiendo dos clones mayoritarios a lo largo de todo el periodo. Aunque casi todos los aislados producían biofilm en algún grado, sólo un 13,5% de ellos tenían un fenotipo hiperproductor de biofilm. El grado de producción de biofilm tenía una distribución clonal. La mayoría de los aislados presentaban motilidad en superficie, no teniendo esta distribución clonal. No se detectó actividad de hemolisinas en medio con sangre humana ni diferencias en la utilización de hierro del medio en ninguno de los aislados. La expresión de *ompA* fue variable en los aislados seleccionados para su determinación, sin que esta variación estuviera explicada por la clonalidad de los mismos.

6.3. OBJETIVO 3. Evaluar la presencia de infección respiratoria, el desarrollo de bacteriemia y la mortalidad en los pacientes críticos con ventilación mecánica relacionados con la adquisición de cepas con distintos factores de virulencia bacteriana anteriormente caracterizados.

6.3.1. Relación de los factores de virulencia con el desarrollo de NAVM.

6.3.1.1. Relación de la formación de *biofilm* con el desarrollo de NAVM.

La producción de biofilm se considera un factor de virulencia que cobra especial importancia en aquellas infecciones asociadas a dispositivos, como es el caso de la NAVM. Existen numerosas evidencias de que los pacientes ventilados tienden a padecer NAVM por los mismos microorganismos que se hallan formando biofilm en sus tubos endotraqueales (279)(280). Por este motivo, se están desarrollando

iniciativas orientadas a reducir la probabilidad de adhesión y formación de biofilm sobre estos dispositivos, como la fabricación de tubos recubiertos por antimicrobianos, aunque hasta el momento ninguna se ha generalizado (281). Sin embargo, no hay datos previos que sugieran claramente una relación entre la producción de biofilm y la mayor incidencia de NAVM por *A. baumannii* en comparación con pacientes intubados y con colonización respiratoria por el mismo microorganismo.

Algunos estudios han detectado que la capacidad de producir biofilm de aislados de *A. baumannii* procedentes de infecciones invasivas (muestras como sangre o líquido cefalorraquídeo), es superior a la de aislados procedentes de infecciones superficiales, como úlceras (274). Sin embargo, en otros estudios, tanto experimentales como clínicos, esta relación no aparece (152) o incluso se da la asociación opuesta. Kempf *et al.* (282) estudiaron los factores de virulencia de dos cepas de *A. baumannii* aisladas del mismo paciente y que presentaban un comportamiento muy diferente en modelos murinos de neumonía. En la primera, que formaba colonias de aspecto mucoso y era hipervirulenta en ratón, se detectó una producción de biofilm notablemente inferior a la de la segunda cepa, mucho menos virulenta en el modelo. De forma análoga, en un estudio realizado por Zhang *et al.* (283) con 121 aislados clínicos de *A. baumannii* procedentes de muestras respiratorias, se encontró que la totalidad de los aislados era productora de biofilm, aunque sólo una proporción de ellos (27,3%) correspondía a aislados hiperproductores. Este fenotipo se asoció con menos incidencia de infección clínica, así como con la estancia en la UCI y el uso previo de antimicrobianos.

Estos resultados parecen contradecir la teoría generalizada de que la combinación de tubo endotraqueal con bacterias productoras de biofilm facilita la aparición de NAVM. Sin embargo, ambas observaciones no tienen por qué ser contradictorias. Por un lado, la producción de biofilm sobre el tubo lo que facilitaría sería la colonización respiratoria, mientras que la ulterior aparición de infección invasiva probablemente dependa de otros factores de virulencia y de la situación del huésped. Por otro lado, no se ha establecido un umbral de producción de biofilm a partir del cual sea más probable la infección invasiva. Al ser prácticamente todas nuestras cepas productoras de biofilm, no podemos comparar la incidencia de NAVM con aislados no productores, sino sólo entre cepas con diferentes grados de producción. Ello podría estar diluyendo el posible efecto de este factor.

6.3.1.2. Relación de la motilidad en superficie con el desarrollo de NAVM.

Las cepas de *A. baumannii* sin motilidad se distribuyeron de manera homogénea en muestras procedentes de pacientes colonizados o con NAVM. Estos resultados sugieren que no existe relación entre este factor y la capacidad de producir infección de *A. baumannii*.

Los estudios realizados sobre motilidad de *A. baumannii* hasta la fecha han estado mucho más orientados a conocer los mecanismos que la producen que su posible papel en la capacidad de *A. baumannii* de producir infecciones en el huésped humano. Con la información de la que disponemos, no podemos asegurar que la motilidad sea un factor de patogenicidad o virulencia. En primer lugar, es un fenotipo obtenido *in vitro* en condiciones diferentes a las que se producen en el huésped, cuya extrapolación al comportamiento *in vivo* es difícil de interpretar. No se han realizado hasta la fecha estudios preclínicos apropiados comparando cepas con y sin motilidad, que podrían aclarar mejor el papel de este factor en la producción de infección (118).

6.3.1.3. Relación de la expresión de OmpA con el desarrollo de NAVM y NAVM bacteriémica. Análisis bivalente y multivariante.

Los aislados procedentes de pacientes con neumonía presentaron una mayor producción de OmpA que los de pacientes colonizados. Igualmente, los que procedían de pacientes con neumonía bacteriémica tuvieron mayor expresión de OmpA que el resto de aislados. Esta relación entre expresión de *ompA* e invasividad clínica se conserva tras ajustar en un modelo multivariante por la clonalidad de los aislados.

Estos resultados clínicos son concordantes con los datos procedentes de estudios experimentales *in vitro* y modelos preclínicos que muestran un rol patogénico de OmpA en la infección pulmonar y la bacteriemia, sugiriendo que esta proteína es fundamental para la patogénesis y virulencia de *A. baumannii* en vías respiratorias y que juega un papel clave en la diseminación a otros órganos y a través del tracto sanguíneo. La incubación *ex vivo* de *A. baumannii* en muestras de lavado broncoalveolar y macrófagos, simulando las condiciones del tracto respiratorio, se relacionaba con un aumento de la producción de OmpA. El gen *ompA* se ha identificado como un gen necesario para la persistencia de *A. baumannii* en modelos de neumonía (284). Son varios los modelos murinos que han encontrado que la producción de OmpA por *K. pneumoniae* y *A. baumannii* juega un papel importante en la progresión de la neumonía (285)(286)(287)(288).

También en otras especies se ha demostrado un papel similar de esta proteína o de sus equivalentes. En *E. coli*, se demostró que era necesaria la expresión de *ompA* para cruzar la barrera hematoencefálica y para inducir bacteriemia de alto inóculo (289)(290). En *P. aeruginosa*, la ausencia de OprF se traduce en una falta de virulencia, ya que disminuye la adhesión a células eucariotas, la secreción de exotoxinas y la producción de factores de virulencia dependientes del *quorum-sensing* (291). Existen otras proteínas de membrana externa asociadas con la aparición de bacteriemia. Es el caso de OmpT, una proteasa de membrana externa que podría contribuir a la virulencia de *E. coli* mediante la inactivación de las proteínas de las defensas de huésped y lisando péptidos de las superficies celulares eucariotas (292). OmpT se identificó como el principal factor de virulencia predictor de bacteriemia por *E. coli* en una cohorte de pacientes veteranos (293). La proteína P2, una porina de *H. influenzae*, se ha asociado con la producción de bacteriemia en crías de rata tras inocularlo intraperitonealmente (294).

Se ha descrito que las condiciones del medio pueden influir sobre la expresión de *ompA*. La expresión de *ompA* en *E. coli* fue diferente según la concentración de glucosa del medio (295). También, como se ha comentado antes, el hecho de cultivar las cepas en un medio similar al lavado broncoalveolar hacía de OmpA se produjera más (284). Sin embargo, podemos constatar que en nuestro estudio la expresión de *ompA* no está determinada por las condiciones del medio, ya que estas fueron las mismas para todas las cepas. Por tanto, este fenotipo corresponde a cambios estables en las cepas de *A. baumannii*, aunque hasta el momento no se han identificado las bases moleculares de estos cambios ni qué circunstancias del medio han podido producir dichos cambios.

La principal limitación para la interpretación de estos resultados es el reducido tamaño muestral. No obstante, dada su coherencia mostrada con los datos experimentales previos, podemos afirmar que se trata de la primera descripción de un factor de virulencia de *A. baumannii* que tiene correlación clínica con una mayor invasividad en forma de neumonía y bacteriemia.

6.3.2. Relación de los factores de virulencia con la mortalidad.

6.3.2.1. Relación de la formación de *biofilm* con la mortalidad.

La hiperproducción de biofilm no se relacionó con la mortalidad, salvo en el subgrupo de pacientes con NAVM bacteriémica. Incluso esta asociación debe ser tomada con cautela: por una parte, el reducido tamaño muestral impide realizar un análisis multivariante y sugiere que la muestra podría no ser lo suficientemente representativa; por otra parte, esta asociación desaparece cuando se analiza la variable “producción de biofilm” con su valor neto, en lugar de clasificado como hiperproductor o no. Cabe destacar que existía agrupación clonal en dos de los tres aislados hiperproductores de biofilm procedentes de pacientes con NAVM bacteriémica que fallecieron. Esto sugiere que podría existir otro factor de virulencia que explicase una mayor virulencia.

Existen pocos estudios que permitan conocer la relación entre la producción de biofilm y el pronóstico de la neumonía producida por *A. baumannii*. Como comentábamos en el epígrafe 6.3.1.1, se demostró una asociación inversa entre la producción de biofilm y la virulencia en dos cepas de *A. baumannii* extraídas del mismo paciente (282). No obstante, lo único que se puede extrapolar de estos resultados es que la producción de biofilm no es un mecanismo imprescindible para la virulencia. La capacidad intrínseca de producir biofilm podría no ser tan importante como que el inóculo infectante proceda de bacterias formando biofilm o de bacterias en fase planctónica, según los resultados de un modelo con *Galleria mellonella* en el que se estudiaron distintos aislados clínicos de *A. baumannii*. En este modelo, los aislados que procedían de cultivos en biofilm producían mayor letalidad que aquellos en fase planctónica (296).

Los datos clínicos al respecto son escasos. En un estudio de seguimiento de pacientes ventilados, el aislamiento de bacterias productoras de biofilm se relacionó con mayores tasas de persistencia microbiana, fallos de tratamiento y recaídas en aquellos pacientes que padecieron una NAVM. No se describe, en cambio, una mayor mortalidad entre los infectados por cepas productoras de biofilm. La interpretación de estos resultados está limitada por el reducido tamaño muestral: 14 pacientes desarrollaron una NAVM, 6 de las cuales estuvieron causadas por *A. baumannii* (280).

En nuestro estudio, la interpretación del pronóstico asociado a la producción de biofilm de las cepas estudiadas podría estar limitada por un tiempo de seguimiento insuficiente y por la elección de las variables resultado. Es posible que, siendo la producción de biofilm un factor que se relaciona con la persistencia en el tiempo,

aumente la posibilidad de padecer neumonías u otras infecciones a medio plazo, y con ello la morbilidad. El diseño de nuestro estudio impide conocer estos resultados.

6.3.2.2. Relación de la motilidad en superficie con la mortalidad.

En el presente estudio no se detectó relación entre la motilidad de los aislados y la mortalidad de los pacientes. Hasta donde sabemos, no existe ningún dato previo que ponga en relación la motilidad de aislados de *A. baumannii* con el pronóstico clínico de las infecciones que producen. Nuestros datos sugieren que dicha relación no existe, no comportándose la motilidad como un factor de virulencia directo. No obstante, como ya comentábamos en el epígrafe 6.3.1.2, está por esclarecer qué relación guardan los resultados de motilidad *in vitro* con el comportamiento *in vivo* de *A. baumannii* y si este factor tiene algún papel en la patogenicidad o virulencia en el huésped humano.

6.3.2.3. Relación de la expresión de OmpA con la mortalidad.

El nivel de expresión de *ompA* se asoció con la mortalidad en los pacientes con NAVM, y no lo hizo ni en el conjunto de la muestra ni en los pacientes colonizados. Este resultado es coherente con la fisiopatología plausible: en el caso de que la expresión de *ompA* se relacione con una mayor mortalidad de los pacientes que adquieren *A. baumannii* en la vía respiratoria, lo hará a través de provocar una infección por las cepas con dicha mayor expresión.

Dentro de los pacientes con NAVM, la expresión de *ompA* se distribuyó de manera desigual entre fallecidos y supervivientes en el grupo de pacientes con NAVM sin bacteriemia que en el grupo de los que tuvieron una NAVM bacteriémica. En los primeros, los fallecidos tuvieron un nivel de expresión notablemente superior, con una mediana que duplica la de los supervivientes. En el caso de los pacientes con bacteriemia, fallecidos y supervivientes tuvieron un índice de expresión de *ompA* similar. Este fue, como ya se ha comentado en apartados anteriores, superior al del conjunto de los pacientes con NAVM sin bacteriemia. Cabe destacar en ambos casos que el tamaño muestral es muy reducido, lo que dificulta extrapolar las conclusiones.

También en el análisis multivariante las distintas poblaciones (muestra global, colonizados y pacientes con NAVM) muestran un comportamiento diferente. En estos análisis se ha excluido la variable “bacteriemia”, por la colinealidad que presenta con la variable “expresión de *ompA*”. La relación de *ompA* con la mortalidad está ajustada por

el índice de Charlson, uno de los principales factores clínicos predictores de mortalidad seleccionados en el análisis clínico y con ninguna correlación plausible ni estadística con la expresión de *ompA*, a diferencia de las variables “shock séptico” o “bacteriemia”, también seleccionadas en el análisis clínico. Podemos observar en las tablas que, si bien no alcanzan la significación estadística, el índice de Charlson es la variable que mejor explica la mortalidad en los pacientes colonizados, mientras que en los pacientes con NAVM, la expresión de *ompA* es la más se relaciona con la mortalidad. Nuevamente, el reducido tamaño muestral limita la potencia estadística y la interpretación de los resultados.

Los resultados obtenidos, aun con sus limitaciones, concuerdan con los datos procedentes de estudios preclínicos. Aunque la literatura previa es menos profusa que para la producción de neumonía o bacteriemia, varios modelos experimentales de infección por bacilos gramnegativos han indicado el papel significativo que tiene OmpA en la mortalidad producida por estas infecciones. La delección del gen de *ompA* convertía a cepas de *A. baumannii* en defectuosas para causar la muerte en sendos modelos murinos de sepsis peritoneal y neumonía (286)(285). Las mutaciones en el loop1 y el loop2 de *ompA* en *E. coli* y una cepa knock-out para el gen de *ompA* de *Enterobacter sakazakii* se relacionaron con una supervivencia significativamente mejor que las cepas salvajes en ratones recién nacidos (297)(298).

Como comentábamos previamente sobre la relación existente entre la producción de OmpA y el desarrollo de NAVM, la novedad que aportan estos datos es la correlación entre la expresión de *ompA in vitro* y el pronóstico vital que tiene la infección por estos aislados. Esta constatación cobra especial relevancia en una cohorte en la que los principales factores relacionados con la mortalidad son clínicos.

En resumen, la expresión de *ompA* se relaciona con la presencia de infección invasiva, alcanzando su máximo nivel de expresión en aislados procedentes de pacientes con NAVM bacteriémica, seguido por los que proceden de pacientes con NAVM sin bacteriemia y, finalmente, por los de pacientes colonizados. Del mismo modo, en pacientes con NAVM, la expresión de *ompA* se relaciona con la mortalidad. Esta diferencia se aprecia especialmente en pacientes con NAVM sin bacteriemia, no existiendo diferencias en el grupo de pacientes con NAVM bacteriémica, en el que todos tienen una expresión de *ompA* elevada. La producción de biofilm y la motilidad en superficie no se relacionan con el comportamiento clínico.

6.4. OBJETIVO 4. Estudiar la asociación entre la presencia de mecanismos de resistencia a imipenem (baja expresión de porinas y presencia de carbapenemasas) y los factores de virulencia en la colección de cepas caracterizadas a partir del objetivo primero.

6.4.1. Mecanismos de resistencia a carbapenemas.

6.4.1.1. Estudio de sensibilidad a los antimicrobianos.

El estudio de sensibilidad a los antimicrobianos seleccionados detectó un perfil general de aislados extremadamente resistentes (XDR), siendo la práctica totalidad de ellos resistente a carbapenemas. Todos conservan, no obstante, la sensibilidad a tigeciclina y colistina; destacando una CMI₉₀ de colistina muy baja.

Estos resultados son concordantes con la epidemiología nacional revelada por un estudio multicéntrico en el que estudiaron 446 aislados clínicos de *A. baumannii* procedentes de 43 hospitales españoles (75). Nuestro hospital contribuyó al mismo con 94 aislados, que se recolectaron entre febrero y marzo de 2010, coincidiendo con el inicio de este estudio. De ellos, el 98% presentaba resistencia a imipenem y hubo un aislado resistente a colistina. En la colección completa, 83% de los aislados fue resistente a carbapenemas, con una CMI₉₀ de meropenem superior a 64 mg/l, mientras que el 97% fue sensible a colistina, siendo su CMI₅₀ $\leq 0,5$ mg/l y su CMI₉₀ = 1 mg/l. También los resultados de actividad de otros antimicrobianos están próximos a los nuestros, con una proporción de aislados resistentes a sulbactam del 65%, a amikacina del 49%, a ciprofloxacino del 94% y a rifampicina del 23,9%. La principal diferencia la constituye tigeciclina, con un 23,9% de aislados resistentes, utilizando los mismos criterios de punto de corte (≤ 1 mg/l, sensible) que el presente estudio. Considerando los criterios de resistencia propuestos por Magiorakos *et al.* (299), el 94% de los aislados presentó multirresistencia, de ellos el 12% correspondió a aislados estrictamente MDR, el 86% fueron aislados XDR y el 2% correspondió a aislados panresistentes (PDR). Este corte de prevalencia contrasta con los resultados de un estudio similar realizado en el año 2000 (76), en el que 52,5% y 46,7% de los aislados fue sensible a imipenem y meropenem, respectivamente. En este caso no se testó la actividad de colistina sino la de polimixina B, con un 100% de aislados sensibles. Las diferencias encontradas entre ambas colecciones de aislados es muy reveladora del claro incremento en la resistencia a algunos antimicrobianos,

especialmente carbapenemas, con las dificultades para seleccionar un tratamiento empírico en las infecciones nosocomiales que ello conlleva.

Nuestros resultados revelan una epidemiología local de avanzada resistencia a carbapenemas. Dentro del ámbito internacional, aunque la tendencia general se dirige hacia un escenario similar, con cada vez más cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenemas, la mayoría de estudios de prevalencia muestran un porcentaje de sensibilidad superior al nuestro (300)(301). De una colección de 4.686 aislados clínicos de *Acinetobacter* spp. procedentes de 157 hospitales de América, Europa y Asia entre 2006 y 2009, el 99,2% fue sensible a colistina y el 55,7%, a imipenem (301). No obstante, existen numerosas descripciones de brotes de *A. baumannii* resistente a carbapenemas, que se ha convertido en endémico en centros de todo el mundo (302)(303)(304)(305). De la misma forma, aunque mucho menos numerosos, se han descrito brotes de cepas resistentes a colistina (303)(306). Uno de ellos, producido por cepas PDR, tuvo lugar en nuestro hospital en el año 2008, pero fue erradicado en un corto periodo de tiempo mediante un programa de intervención multifacético, sin que ello evitara la persistencia de una endemia de *A. baumannii* sensible a colistina (95).

El consumo de antimicrobianos destaca como un factor de riesgo clave en la aparición de *A. baumannii* MDR (68)(240)(48)(49). En nuestra cohorte de pacientes, una amplia mayoría había recibido antibioterapia de amplio espectro, con un uso de carbapenemas elevado. Este perfil de prescripción, en un entorno con elevada presión de colonización por *A. baumannii*, favorece la selección y diseminación de clones con mecanismos de resistencia a carbapenemas.

6.4.1.2. Caracterización de carbapenemasas.

6.4.1.2.1. Presencia de carbapenemasas y relación con la CMI de imipenem. Distribución clonal.

En la colección de aislados de *A. baumannii* estudiada, el mecanismo de resistencia a carbapenemas mayoritario fue *bla*OXA58. Se encontró *bla*OXA-40 en una proporción inferior de casos y la secuencia *ISAba1* –*bla*OXA51 en el 8,7% de los aislados, siempre asociada a otra carbapenemasa. No se detectó ningún aislado con *bla*OXA-23 o MBL. La cepa sensible a imipenem y meropenem no presentaba mecanismos de resistencia a carbapenemas.

Las oxacilinasas OXA-58 y OXA-40 son los mecanismos de resistencia a carbapenemas que predominan en nuestro entorno, como han puesto de manifiesto algunos estudios realizados con aislados clínicos de *A. baumannii* procedentes de

hospitales españoles en la última década (138)(225). En cambio, las comunicaciones sobre aislados clínicos de *A. baumannii* portadores de *bla*OXA-23 en España son escasas y recientes, y solo una de ellas corresponde a un brote con más de un caso (139)(140)(307). No se han comunicado brotes por cepas portadoras de esta carbapenemasa en España. Esta epidemiología difiere de la de otros países europeos, como es el caso de Italia, donde OXA-23 está ampliamente diseminada y constituye el mecanismo de resistencia a carbapenemas más frecuente entre los aislados clínicos de *A. baumannii*, seguida de OXA-58 (308).

En ninguno de nuestros aislados se detectó la presencia concomitante de *bla*OXA-40 y *bla*OXA-58. Hasta donde sabemos, no se ha comunicado ningún caso en el que coexistan ambas carbapenemasas adquiridas en la misma cepa de *A. baumannii*. En cambio, *bla*OXA-23 sí puede coexistir con ella, como se ha demostrado al caracterizar algunos brotes de *A. baumannii* resistente a carbapenemas (309).

A nivel global, las MBL no son un mecanismo de resistencia tan importante como las oxacilinasas para *A. baumannii*. Como comentábamos previamente, se han comunicado casos de aislados portadores de IMP, VIM, SIM y NDM en todos los continentes, pero hasta la fecha no se ha descrito en ninguno procedente de hospitales españoles. Por tanto, la epidemiología encontrada es similar a la esperable según los datos de que disponemos.

Existió tendencia a la agrupación clonal de los genes codificadores de carbapenemasas, especialmente en el clon 7 (todos los aislados eran portadores de *bla*OXA-40 y el 63% de *ISAbal* –*bla*OXA-51) y en los clones 2 y 4 (todos, salvo dos, eran portadores del gen de *bla*OXA58). Esta ausencia de concordancia entre clonalidad y mecanismos de resistencia es similar a la detectada en estudios previos. En otros, en cambio, existe una elevada concordancia entre la relación clonal determinada por PFGE y las oxacilinasas que portan los aislados de *A. baumannii* (269). La ausencia de concordancia observada en nuestra colección de aislados estaría explicada por la transferencia de mecanismos de resistencia entre distintas cepas, probablemente a través de plásmidos, ya que es el mecanismo principal de transmisión de genes de carbapenemasas (134). Una técnica de tipado de elementos móviles podría aclarar la secuencia temporo-espacial de transmisión de los mismos (270).

Aunque todos los aislados productores de carbapenemasas eran resistentes a carbapenemas, la CMI₅₀ de imipenem fue dos diluciones superior en los aislados portadores de *bla*OXA-40 que en los portadores de *bla*OXA-58, a igualdad de

expresión de *blaOXA-51*. Asimismo, aquellas con la secuencia *ISAb1-blaOXA-51* aumentaban en una dilución su CMI₅₀ en una dilución respecto a aislados con la misma carbapenemasa (*blaOXA-40* o *blaOXA-58*) y sin expresión de *blaOXA-51*. Estos resultados son similares a lo previamente descrito (138)(134). Algunos autores han comunicado, incluso, aislados de *A. baumannii* que a pesar de ser portadores de *blaOXA-58* eran sensibles a imipenem (310). Hérítier *et al.*(128) realizaron un estudio exhaustivo de los cambios en la sensibilidad a carbapenemas con cepas knock-out y experimentos de transformación usando plásmidos, tanto naturales como recombinantes, que contenían *blaOXA-23*, *blaOXA-40* o *blaOXA-58*. Estos experimentos mostraron que las carbapenemasas adquiridas contribuían significativamente al fenotipo de resistencia, produciendo OXA-40 y OXA-23 mayor impacto sobre la resistencia a carbapenemas que OXA-58.

La disparidad de la CMI de imipenem en aislados con el mismo patrón de carbapenemasas podría estar explicada por la presencia de elementos reguladores cuya presencia o actividad desconocemos al no haber sido determinados en nuestro estudio. En el estudio de Hérítier *et al.*(128) mencionado previamente, los autores observaron que las oxacilinasas expresadas a partir de plásmidos naturales aumentaban la resistencia a carbapenemas en mayor medida que las expresadas a partir de plásmidos recombinantes. Ello refuerza la teoría de que los elementos reguladores próximos a los genes de oxacilinasas tienen gran importancia como potenciadores de su expresión y del nivel de resistencia a carbapenemas. Las secuencias de inserción son los elementos reguladores de oxacilinasas más frecuentemente reportados en *A. baumannii*. Para *blaOXA-58*, se describieron inicialmente *ISAb1*, *ISAb2*, *ISAb3* e *IS18* como secuencias de inserción promotoras (311)(137). Más recientemente, varios autores han mostrado también el papel regulador sobre *blaOXA-58* de *ISAb825* (312)(131). De manera análoga, la regulación de *blaOXA-23* se ha asociado con las secuencias de inserción promotoras *ISAb1* e *ISAb4* (313). En cambio, *blaOXA-40* no se relaciona con secuencias de inserción. Merino *et al.*(314) secuenciaron varios plásmidos procedentes de aislados de *A. baumannii* en los que se encontró el gen *blaOXA-40*, flanqueado en todos los casos por el sistema XerC/XerD, cuya función no está relacionada con la promoción de la expresión sino con la recombinación y movilización de fragmentos de ADN. En el caso de *blaOXA-51*, es imprescindible la presencia de un elemento que potencie su expresión para que confiera resistencia a carbapenemas. Además de *ISAb1*, otras secuencias de inserción (como *ISAb825* e *ISAb9*) también pueden participar en su

regulación (131)(130). En el presente estudio, el único elemento regulador analizado fue la secuencia *ISAbal-blaOXA-51*, por lo que desconocemos si existen otros mecanismos que puedan estar influyendo en el nivel de resistencia a carbapenemas y expliquen, al menos parcialmente, las diferencias de CMI dentro de aislados con la misma carbapenemasa (Tabla 30). La detección por PCR de los mecanismos reguladores conocidos o el empleo de técnicas de detección de la expresión de los genes de las distintas oxacilinasas habrían permitido un conocimiento más exhaustivo de la correlación entre CMI de imipenem o meropenem y mecanismos de resistencia.

6.4.1.3. Estudio de proteínas de membrana externa y expresión de porinas.

6.4.1.3.1. Caracterización de la expresión de porinas y relación con CMI de imipenem. Distribución clonal.

La pérdida de proteínas de membrana externa es uno de los mecanismos más importantes entre los que contribuyen a las resistencias microbianas en las bacterias gramnegativas. En *A. baumannii*, estudios previos han demostrado que CarO forma poros en la membrana, con un sitio de unión para imipenem entre otros sustratos, y que se encuentra ausente en algunas cepas de *A. baumannii* resistente a imipenem (142)(315). La primera descripción de CarO la hicieron Limansky *et al.*(209) a partir del estudio de las proteínas de membrana de externa de aislados clínicos de *A. baumannii* resistente a carbapenemas que no presentaban ningún otro mecanismo de resistencia a estos fármacos, y de una cepa resistente obtenida por selección en medio con imipenem.

En nuestro estudio, no apreciamos contribución de la pérdida de producción de CarO al valor de la CMI de imipenem dentro de grupos de aislados con el mismo perfil de carbapenemasas. Estos resultados contrastan con los que muestran de manera razonablemente sólida que la pérdida de CarO provoca resistencia a carbapenemas. A pesar de la aparente contradicción, estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (316)(317)(318)(319). Lee *et al.* (317) estudiaron un brote de *A. baumannii* productor de OXA-23. En trece aislados se determinó la producción de CarO, estando ésta intacta en un caso y perdida en el resto. A pesar de esta diferencia, todos los aislados tenían una CMI de imipenem de 32 mg/l. Sen *et al.*(318) publicaron recientemente un estudio en el caracterizan los mecanismos de resistencia a carbapenemas de una colección de 16 aislados clínicos de *A. baumannii* MDR. Todas las cepas eran resistentes a imipenem y presentaban una baja expresión de

carO pero sólo dos de ellas portaban genes de carbapenemasas. A pesar de que la baja producción de CarO explicaría la resistencia, la cuantificación del nivel de expresión de *carO* no se relacionó de manera directa con la CMI de imipenem, teniendo algunas cepas con mayor nivel de expresión una CMI menor, y viceversa. En la misma línea, Fernando *et al.* (319) encontraron una baja expresión de *carO* en 10 aislados de *A. baumannii*, todos ellos MDR pero sensibles a carbapenemas. Un estudio con mayor número de cepas pertenecientes a 14 clones distintos de diversas áreas de Brasil analizó la expresión de *carO* mediante estudio transcriptómico y la presencia de genes de carbapenemasas, con o sin la secuencia *ISAba1* en su promotor, mediante PCR. Solamente una cepa expresaba CarO significativamente menos que las demás. Esta cepa no poseía ninguna carbapenemasa adquirida, siendo su CMI de imipenem 0,2 mg/l (320). Ello sugiere que existen otras proteínas que permiten el paso a través de la membrana de imipenem. En este estudio se analizaron también los diversos isotipos de CarO, detectando que las diversas composiciones de aminoácidos de esta porina tenían más relación con la sensibilidad a imipenem, probablemente por cambios en la afinidad del poro, que el propio nivel de expresión. Tomada en conjunto, toda esta información sugiere que el papel de la pérdida de CarO como mecanismo de resistencia a carbapenemas, que parece claro en algunas cepas sin otro mecanismo asociado, no incrementa la resistencia a carbapenemas cuando coexiste en el mismo aislado con una carbapenemasa. Son necesarios estudios ulteriores que caractericen adecuadamente el papel de CarO en este contexto.

Además de todo lo expuesto, hay que tener en cuenta que la expresión de las proteínas de membrana externa de *A. baumannii*, incluyendo *carO*, se ve notablemente influenciada por diversas condiciones del medio (temperatura, osmolaridad, presencia de determinados solutos, entre otras) (321). En nuestro caso, analizamos la producción de proteína. En otros estudios, se realizó análisis de la expresión mediante RT-PCR. Es posible que la disparidad encontrada entre los distintos estudios no se deba solamente a diferencias entre las cepas sino a pequeñas variaciones en los métodos, y que sus resultados no sean completamente comparables por este motivo.

La sobreexpresión de *blaOXA-51* se ha relacionado en algunos estudios con una expresión reducida de *carO* y *omp33*, mientras que en otros no se ha detectado asociación entre ellas, como es nuestro caso (138). Dicha correlación está probablemente causada por la presencia de secuencias de inserción, ya que éstas, además de aumentar la expresión de diversos genes de carbapenemasas, pueden

impedir la síntesis de CarO mediante la disrupción de su gen por inserción dentro del mismo. Las secuencias que se han demostrado involucradas en este mecanismo son IS*Aba1*, IS*Aba10* y IS*Aba125* (317)(320)(315)(120).

6.4.1.4. Relación entre los mecanismos de resistencia y los factores de virulencia. Distribución clonal.

A. baumannii como microorganismo nosocomial produce gran preocupación debido a su capacidad para sobrevivir y diseminarse en el ambiente hospitalario, y por su facilidad para desarrollar resistencias microbianas. En cambio, las infecciones que produce suelen ser menos virulentas que las provocadas por otros microorganismos nosocomiales, como *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Por este motivo, es un escenario preocupante la posibilidad de brotes provocado por *A. baumannii* XDR con elevada virulencia. Jones *et al.* (322) caracterizaron los genes relacionados con la virulencia y las resistencias microbianas de una clona de *A. baumannii* XDR que provocó un brote hospitalario con una elevada letalidad, tanto entre los pacientes que lo adquirieron como en un modelo *in vivo* de neumonía en ratón. Esta cepa no pertenecía a ningún clon internacional, no era portadora de carbapenemasas y poseía 208 genes que codificaban diversos factores de virulencia, distribuidos en: adquisición de hierro (68 *loci*), adhesión e invasión celular (67 *loci*), sistemas secretores (45 *loci*), formación de películas (22 *loci*) y toxinas (6 *loci*). Aunque hasta la fecha no se ha comunicado la diseminación de clones XDR e hipervirulentos, la aparición de clones exitosos con estas características es un escenario plausible en el futuro para el que debe mantenerse una vigilancia estrecha, como ya alertan algunos expertos (323). En nuestro estudio se detecta una distribución clonal de los fenotipos de producción de biofilm y de las carbapenemasas, produciendo una mayor letalidad (aunque no significativa) los aislados pertenecientes a los clones 6 y 7, que eran más productores de biofilm y portadores de *bla*_{OXA-40}. Estos datos, aun siendo insuficientes para afirmarlo, sugieren la existencia de una cepas más virulentas y “exitosas” que otras.

En estudios precedentes, se ha mostrado asociación en aislados clínicos de *A. baumannii* entre formación de biofilm y mayor grado de resistencias antibióticas (274)(201)(202). En cambio, otros estudios no han encontrado dicha asociación (152). Dhabaan *et al.* (324) estudiaron la expresión de diversos factores de virulencia en presencia de imipenem de una cepa de *A. baumannii* resistente a imipenem. En medios con una concentración subinhibitoria del fármaco, esta cepa aumentaba la expresión de genes reguladores de los pili tipo IV, producía más biofilm y tenía más

motilidad que en situación basal y que una cepa sensible a imipenem. No obstante, no se comprobó si estos efectos persistían tras la vuelta a un medio sin imipenem. También existen datos contradictorios respecto a la relación entre formación de biofilm y mecanismos de resistencia concretos. Azizi *et al.* (309) describieron, en una colección de 65 aislados clínicos procedentes de dos hospitales iraníes, que aquellos sensibles a imipenem y sin *bla*OXA-40 formaban menos biofilm que los que contenían esta carbapenemasa. No obstante, la ausencia de estudio de clonalidad limita la interpretación de sus resultados. Esta ausencia de concordancia entre estudios apoya la idea de que la resistencia a carbapenemas y la formación de biofilm son características independientes que pueden o no coexistir en un aislado capaz de producir infección.

En resumen, el estudio de sensibilidad reveló un perfil general de aislados MDR o XDR. Solo uno de ellos fue sensible a carbapenemas, no presentando ningún mecanismo de resistencia frente a estos fármacos. Todos fueron sensibles a tigeciclina y colistina, siendo la CMI₉₀ de esta última muy baja (0,12 mg/l), lo cual parece justificar su elevada efectividad clínica a pesar de las bajas dosis utilizadas. Todos los aislados salvo el que era sensible a carbapenemas eran portadores de carbapenemasas adquiridas. El 83,2% de ellos tenían *bla*OXA-58, mientras que el 16,8% tenían *bla*OXA-40, alcanzado estas últimas un mayor nivel de resistencia a imipenem que las primeras. En once aislados se detectó la secuencia *ISAb_a1* en el promotor de la carbapenemasa constitutiva *bla*OXA-51, lo cual aumentaba la CMI de imipenem de estos aislados en una dilución respecto a otros con la misma oxacilinasas adquirida. En una pequeña proporción de aislados, estaba ausente la proteína CarO de la membrana externa, pero ello no aumentó el nivel de resistencia en los mismos. Aunque la ausencia de CarO en la membrana externa se ha definido como un factor no enzimático de resistencia a carbapenemas en aislados de *A. baumannii* que no tenían ningún otro, nuestros resultados y los de otros autores en la misma obligan a replantear el posible papel de este mecanismo de resistencia en aislados portadores de carbapenemasas. Se encontraron dos clonas que contienen aislados más resistentes a imipenem, relacionada con la presencia de *bla*OXA-40 y, en algunos casos, de *ISAb_a1-bla*OXA-51, que agrupan la mayoría de aislados hiperproductores de biofilm y que se relacionan con una mortalidad superior, el número de casos impide afirmar que se trate de cepas hipervirulentas o clones exitosos.

VII. CONCLUSIONES.

1. La incidencia acumulada de NAVM en los pacientes críticos ventilados que adquirieron *A. baumannii* en las vías respiratorias inferiores fue del 57%, siendo el 26% de ellas bacteriémicas. No existieron diferencias significativas en las características epidemiológicas basales (motivo de ingreso, comorbilidades, gravedad al ingreso) entre los pacientes con NAVM y los que sólo estuvieron colonizados. Los primeros tendieron a tener más complicaciones (shock séptico, fracaso renal agudo, ventilación mecánica más prolongada), pero no existieron diferencias significativas respecto al grupo de pacientes colonizados.

2. En los pacientes con aislamiento de *A. baumannii* en vías respiratorias bajas, la frecuencia de tratamiento antimicrobiano previo es del 93%. El tratamiento con β -lactámicos de amplio espectro (carbapenemas, piperacilina/tazobactam, cefepima) y vancomicina se asocia con el ulterior desarrollo de NAVM.

3. Los pacientes con NAVM por *A. baumannii* recibieron tratamiento antimicrobiano apropiado con colistina en una proporción muy elevada (92,9%), como consecuencia de la situación de endemidad por cepas MDR de esta bacteria en el centro donde se realizó el estudio. La dosis mayoritaria fue 6 MU cada 8 horas, sin dosis de carga inicial.

4. La concentración bacteriana en muestras de vías respiratorias bajas fue elevada tanto en pacientes colonizados como en pacientes con NAVM, por encima del umbral de $6 \log_{10}$ UFC/ml considerado como estándar para el diagnóstico de infección respiratoria, en las muestras analizadas. Esta concentración elevada se produjo en todos los clones, exceptuando al único representante del clon 5, y se mantiene en niveles similares a lo largo del tiempo. Por tanto, la concentración bacteriana de *A. baumannii* en muestras respiratorias no permite discriminar *per se* entre colonización y NAVM.

5. La mortalidad a los 30 días de los pacientes con NAVM causada por *A. baumannii* resistente a carbapenemas se equiparó en nuestro estudio a la de aquellos que sólo tuvieron colonización respiratoria, siendo significativamente menor a la mortalidad de esta entidad reportada por otros autores. Los factores de riesgo de mortalidad en el conjunto de pacientes ventilados que adquieren *A. baumannii* en vías respiratorias bajas, así como en el grupo de pacientes colonizados, son la

comorbilidad previa (índice de Charlson) y las complicaciones graves durante el ingreso (shock séptico o fracaso renal agudo). En pacientes con NAVM por *A. baumannii*, la bacteriemia concomitante por *A. baumannii* se añade como factor de riesgo de mortalidad a la comorbilidad previa (índice de Charlson) y las complicaciones durante el ingreso (fracaso renal agudo).

6. Los pacientes con NAVM bacteriémica por *A. baumannii* presentan una supervivencia menor que aquellos con NAVM no bacteriémica, que persiste tras ajustar por otros factores (HR 4,67). El tratamiento apropiado con colistina es un factor asociado a buen pronóstico (HR 0,02). La elevada tasa de tratamiento apropiado explicaría que la mortalidad de los pacientes con NAVM por *A. baumannii* de nuestra cohorte sea inferior a la de otras series y similar a la de pacientes colonizados.

7. La NAVM por *A. baumannii* prolonga la estancia en UCI de los pacientes respecto a la colonización respiratoria (OR 1,88). En cambio, los pacientes con NAVM no tienen mayor tiempo de ventilación mecánica ni una estancia hospitalaria superior.

8. Los aislados de *A. baumannii* se agruparon en 3 clones por REP-PCR y en 7 clones por PFGE. La distribución es desigual, perteneciendo la mayoría de aislados a los pulsotipos nombrados como 4 y 2 (56% y 24,5%, respectivamente). Los aislados pertenecientes a ambos clones aparecen de manera regular durante todo el periodo de estudio, mientras que el resto son esporádicos o se agrupan en forma de brotes.

9. La mayoría de los aislados estudiados eran productores de biofilm en algún grado, pero sólo el 13,5% de ellos presentaba un fenotipo hiperproductor. El grado de formación de biofilm se relaciona con la clonalidad, agrupándose la mayoría de aislados hiperproductores en dos clones. El 89% de los aislados de *A. baumannii* estudiados presentaba motilidad en superficie, no existiendo distribución clonal de la misma. No se detectó producción de hemolisinas ni diferencias en la capacidad de captación de hierro en los aislados estudiados.

10. La expresión de OmpA de los aislados se relaciona con un comportamiento clínico con gravedad diferente; los aislados procedentes de pacientes con NAVM bacteriémica presentan el nivel de expresión de OmpA más elevado, seguido de los pacientes con NAVM no bacteriémica y, finalmente, de los colonizados.

11. La expresión de OmpA de *A. baumannii* es un factor predictor de mortalidad en los pacientes con NAVM por este microorganismo. Esta relación se observa, especialmente, en pacientes con NAVM no bacteriémica, mientras que se pierde en los que tuvieron NAVM y bacteriemia por *A. baumannii*. El resto de factores de virulencia estudiados (producción de biofilm y motilidad) no presentan relación con la mortalidad de los pacientes.

12. Los aislados de *A. baumannii* estudiados presentaban un fenotipo general MDR o XDR. Solo uno de ellos fue sensible a carbapenemas y todos fueron sensibles a tigeciclina y colistina, teniendo una CMI₉₀ de colistina muy baja (0,12 mg/l). Ello justifica la elevada eficacia clínica de la colistina empleada en la mayoría de los pacientes con NAVM, a pesar de haberse utilizado dosis inferiores a las actualmente recomendadas.

13. Todos los aislados resistentes a carbapenemas eran portadores de una oxacilinasa adquirida. En nuestro medio, la oxacilinasa más prevalente es *bla*OXA-58, seguida de *bla*OXA-40, no estando presentes ni *bla*OXA-23 ni ninguna MBL. En una proporción menor, y siempre acompañada por otra carbapenemasa, existen algunos aislados de *A. baumannii* en los que la sobreexpresión de *bla*OXA-51 debido a la presencia en su promotor de la secuencia *ISAbal* contribuye a incrementar la resistencia a carbapenemas. OXA-40 confiere mayor nivel de resistencia que OXA-58. Aunque algunos aislados presentan ausencia de la porina CarO en su membrana externa, ello no contribuye a incrementar la resistencia a carbapenemas, como se ha observado en estudios anteriores.

VIII. REFERENCIAS.

1. Allen DM, Hartman BJ. *Acinetobacter* Species. En: Mandell, GL, Bennett JE, Dolin R editores. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000, p 2339-2344.
2. <http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>. Consultado: 24 septiembre 2015.
3. Starakis I, Blikas A, Siagris D, Marangos M, Karatza C and Bassaris H. Prosthetic valve endocarditis caused by *Acinetobacter lwoffii*: a case report and review. *Cardiol Rev* 2006; 14: 45-9.
4. Crawford PM, Jr., Conway MD and Peyman GA. Trauma-induced *Acinetobacter lwoffii* endophthalmitis with multi-organism recurrence: strategies with intravitreal treatment. *Eye (Lond)* 1997; 11 (6): 863-4.
5. Castellanos Martinez E, Telenti Asensio M, Rodriguez Blanco VM, Rodriguez Suarez ML, Morena Torrico A and Cortina Llosa A. Infective endocarditis of an interventricular patch caused by *Acinetobacter haemolyticus*. *Infection* 1995; 23: 243-5.
6. Grotiuz G, Sirok A, Gadea P, Varela G and Schelotto F. Shiga toxin 2-producing *Acinetobacter haemolyticus* associated with a case of bloody diarrhea. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3838-41.
7. Molina J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Rodríguez-Baño J, Ribera A, Beceiro A, et al. Clinical features of infections and colonization by *Acinetobacter* genospecies 3. *J Clin Microbiol*. 2010; 48 (12): 4623–6.
8. Turton JF, Shah J, Ozongwu C and Pike R. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1445-9.
9. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996; 9: 148-65.
10. Henriksen SD. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the Mimeae. *Bacteriol Rev* 1973; 37: 522-61.
11. Jawad A, Heritage J, Snelling AM, Gascoyne-Binzi DM and Hawkey PM. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2881-7.
12. Musa EK, Desai N and Casewell MW. The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. *J Hosp Infect* 1990; 15: 219-27.
13. Towner K. The genus *Acinetobacter*. *Prokaryotes* 2006; 6: 746-58.
14. Hirai Y. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *J Hosp Infect* 1991; 19: 191-200.
15. Jain R, Danziger LH. Multidrug-resistant *Acinetobacter* infections: an emerging

challenge to clinicians. *Ann Pharmacother* 2004; 38: 1449-59.

16. Wendt C, Dietze B, Dietz E and Ruden H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1394-7.

17. Alfa MJ, Sitter DL. In-hospital evaluation of contamination of duodenoscopes: a quantitative assessment of the effect of drying. *J Hosp Infect* 1991; 19: 89-98.

18. Patterson JE, Vecchio J, Pantelick EL, et al. Association of contaminated gloves with transmission of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* in an intensive care unit. *Am J Med* 1991; 91: 479-83.

19. Weernink A, Severin WP, Tjernberg I and Dijkshoorn L. Pillows, an unexpected source of *Acinetobacter*. *J Hosp Infect* 1995; 29: 189-99.

20. Allen KD, Green HT. Hospital outbreak of multi-resistant *Acinetobacter anitratus*: an airborne mode of spread? *J Hosp Infect* 1987; 9: 110-9.

21. Ye D, Shan J, Huang Y, Li J, Li C, Liu X, et al. A gloves-associated outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in Guangdong, China. *BMC Infect Dis*. 2015; 15: 179.

22. Berlau J, Aucken H, Malnick H, Pitt T. Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. 1999; 18 (3): 179–83.

23. Peacock JE, Jr., Sorrell L, Sottile FD, Price LE and Rutala WA. Nosocomial respiratory tract colonization and infection with aminoglycoside-resistant *Acinetobacter calcoaceticus* var *anitratus*: epidemiologic characteristics and clinical significance. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1988; 9: 302-8.

24. Rodriguez-Bano J, Pascual A, Galvez J, et al. *Acinetobacter baumannii* bacteremia: clinical and prognostic features. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 242-7.

25. Wise KA, Tosolini FA. Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species. *J Hosp Infect* 1990; 16: 319-29.

26. Sakata H, Fujita K, Maruyama S, Kakehashi H, Mori Y, Yoshioka H. *Acinetobacter calcoaceticus* biovar *anitratus* septicaemia in a neonatal intensive care unit: epidemiology and control. *J Hosp Infect* 1989; 14: 15-22.

27. Smith PW, Massanari RM. Room humidifiers as the source of *Acinetobacter* infections. *JAMA* 1977; 237: 795-7.

28. Ushizawa H, Yahata Y, Endo T, Iwashima T, Misawa M, Sonobe M, et al. An epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a critical care center in Japan, 2011-2012. *Jpn J Infect Dis*.

2015. [Epub ahead of print]

29. Halachev MR, Chan JZ-M, Constantinidou CI, Cumley N, Bradley C, Smith-Banks M, *et al.* Genomic epidemiology of a protracted hospital outbreak caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Birmingham, England. *Genome Med.* 2014; 6 (11): 70.
30. Villalón P, Valdezate S, Cabezas T, Ortega M, Garrido N, Vindel A, *et al.* Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. *BMC Microbiol.* 2015; 15: 47.
31. Dijkshoorn L, Nemec A and Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 939-51.
32. van den Broek PJ, Arends J, Bernards AT, *et al.* Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 837-43.
33. van Dessel H, Dijkshoorn L, van der Reijden T, *et al.* Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 2004; 155: 105-12.
34. Falagas ME, Karveli EA, Kelesidis I and Kelesidis T. Community-acquired *Acinetobacter* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 857-68.
35. Ho PL, Cheng VC and Chu CM. Antibiotic resistance in community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii*. *Chest* 2009; 136: 1119-27.
36. Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Vila J, Pascual A, *et al.* Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004; 25 (10): 819–24.
37. Eberle BM, Schnüriger B, Putty B, Barmparas G, Kobayashi L, Inaba K, *et al.* The impact of *Acinetobacter baumannii* infections on outcome in trauma patients: a matched cohort study. *Crit Care Med.* 2010; 38 (11): 2133–8.
38. Peleg AY, Seifert H and Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 538-82.
39. Martone WJ, Gaynes RP, Horan TC, *et al.* National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) semiannual report, May 1995. A report from the National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. *Am J Infect Control* 1995; 23: 377-85.
40. Craven DE, Barber TW, Steger KA, Montecalvo MA. Nosocomial pneumonia in

the 1990s: update of epidemiology and risk factors. *Semin Respir Infect* 1990; 5: 157-72.

41. Wu CL, Yang DI, Wang NY, Kuo HT, Chen PZ. Quantitative culture of endotracheal aspirates in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia in patients with treatment failure. *Chest*. 2002; 122 (2): 662–8.

42. Garcia-Garmendia JL, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jimenez-Jimenez FJ, Monterrubio-Villar J, Gili-Miner M. Mortality and the increase in length of stay attributable to the acquisition of *Acinetobacter* in critically ill patients. *Crit Care Med* 1999; 27: 1794-9.

43. Martínez-Pellús A, Ruiz Gómez J, Jaime-Sánchez F, Simarro-Córdoba E, Fernández-Lozano JA. Incidence of colonization and infection by *Acinetobacter baumannii* in an endemic setting (ICU). Analysis of risk factors by means of a surveillance study. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20 (5): 194-9.

44. Cisneros JM, Rodriguez-Bano J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 687-93.

45. Rodríguez A, Póvoa P, Nseir S, Salluh J, Curcio D, Martín-Loeches I, *et al*. Incidence and diagnosis of ventilator-associated tracheobronchitis in the intensive care unit: an international online survey. *Crit Care Lond Engl*. 2014; 18 (1): R32.

46. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Díaz E, Rello J. Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. *Crit Care Med* 2003; 31 (10): 2478-82.

47. Seifert H, Gerner-Smidt P. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1402-7.

48. Cisneros JM, Reyes MJ, Pachón J, Becerril B, Caballero FJ, García-Garmendía JL, Ortiz C, Cobacho AR. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, clinical findings, and prognostic features. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 1026-32.

49. Cisneros JM, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: a nosocomial pathogen difficult to control. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003; 21: 221-3.

50. Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Gibert C. Mortality due to ventilator-associated pneumonia or colonization with *Pseudomonas* or *Acinetobacter* species: assessment by quantitative culture of samples obtained by a protected specimen brush. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 538-42.

51. Chopra T, Marchaim D, Johnson PC, Awali RA, Doshi H, Chalana I, *et al*. Risk

- factors and outcomes for patients with bloodstream infection due to *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58 (8): 4630–5.
52. Zhou H-Y, Yuan Z, Du Y-P. Prior use of four invasive procedures increases the risk of *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia among patients in intensive care units: a systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis 2014; 22: 25–30.
53. Nutman A, Glick R, Temkin E, Hoshen M, Edgar R, Braun T, *et al.* A case-control study to identify predictors of 14-day mortality following carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. Clin Microbiol Infect 2014; 20 (12): O1028–34.
54. Zheng Y, Wan Y, Zhou L, Ye M, Liu S, Xu C, *et al.* Risk factors and mortality of patients with nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia. Am J Infect Control. 2013; 41 (7): e59–63.
55. Chen HP, Chen TL, Lai CH, Fung CP, Wong WW, Yu KW, *et al.* Predictors of mortality in *Acinetobacter baumannii* bacteremia. J Microbiol Immunol Infect 2005; 38: 127-36.
56. Vardakas KZ, Rafailidis PI, Konstantelias AA, Falagas ME. Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria: the study, the patient, the bug or the drug? J Infect. 2013; 66 (5): 401–14.
57. Lemos EV, de la Hoz FP, Einarson TR, McGhan WF, Quevedo E, Castañeda C, *et al.* Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. Clin Microbiol Infect 2014; 20 (5): 416–23.
58. Fagon JY, Chastre J, Hance AJ, Montravers P, Novara A, Gibert C. Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. Am J Med 1993; 94: 281-8.
59. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Fernández-Hinojosa E, *et al.* *Acinetobacter baumannii* ventilador-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. Intensive Care Med 2005; 31: 649-55.
60. Tseng CC, Liu SF, Wang CC, Tu ML, Chung YH, Lin MC, Fang WF. Impact of clinical severity index, infective pathogens, and initial empiric antibiotic use on hospital mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. Am J Infect Control 2012; 40 (7): 648-52.
61. Falagas ME, Rafailidis PI. Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. Crit Care 2007; 11: 134.
62. Falagas ME, Kopterides P and Siempos, II. Attributable mortality of

Acinetobacter baumannii infection among critically ill patients. Clin Infect Dis 2006; 43: 389-90.

63. Gkrania-Klotsas E, Hershow RC. Colonization or infection with multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* may be an independent risk factor for increased mortality. Clin Infect Dis 2006; 43: 1224-5.

64. Chang H-C, Chen Y-C, Lin M-C, Liu S-F, Chung Y-H, Su M-C, *et al.* Mortality risk factors in patients with *Acinetobacter baumannii* ventilator: associated pneumonia. J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi. 2011; 110 (9): 564–71.

65. Özgür ES, Horasan ES, Karaca K, Ersöz G, Naycı Atış S, Kaya A. Ventilator-associated pneumonia due to extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors, clinical features, and outcomes. Am J Infect Control. 2014; 42 (2): 206–8.

66. Park SY, Choo JW, Kwon SH, Yu SN, Lee EJ, Kim TH, *et al.* Risk factors for mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia. Infect Chemother 2013; 45 (3): 325–30.

67. Lee H-Y, Chen C-L, Wu S-R, Huang C-W, Chiu C-H. Risk factors and outcome analysis of *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia in critical patients. Crit Care Med 2014; 42 (5): 1081-8.

68. Chopra T, Marchaim D, Awali RA, Krishna A, Johnson P, Tansek R, Chaudary K, Lephart P, Slim J, Hothi J, Ahmed H, Pogue JM, Zhao JJ, Kaye KS. Epidemiology of bloodstream infections caused by *Acinetobacter baumannii* and impact of drug resistance to both carbapenems and ampicillin-sulbactam on clinical outcomes. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57 (12): 6270-5.

69. Lee N-Y, Chang TC, Wu C-J, Chang C-M, Lee H-C, Chen P-L, *et al.* Clinical manifestations, antimicrobial therapy, and prognostic factors of monomicrobial *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia. J Infect. 2010; 61 (3): 219–27.

70. Blot S, Chen CL, Wu SR, Huang CW, Chiu CH. Nosocomial bacteremia involving *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. Int Care Med 2003; 29: 471-5.

71. Grupper M, Sprecher H, Mashiach T, Finkelstein R. Attributable mortality of nosocomial *Acinetobacter* bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol 2007; 28: 293-8.

72. Lee YT, Kuo SC, Yang SP, Lin YT, Tseng FC, Chen TL, Fung CP. Impact of appropriate antimicrobial therapy on mortality associated with *Acinetobacter baumannii* bacteremia: relation to severity of infection. Clin Infect Dis 2012; 55 (2): 209-15.

73. Tseng YC, Wang JT, Wu FL, Chen YC, Chie WC, Chang SC. Prognosis of adult patients with bacteremia caused by extensively resistant *Acinetobacter baumannii*.

Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59: 181–90.

74. Asensio A, Cantón R, Vaqué J, Calbo-Torrecillas F, Herruzo R, Arribas JL, Sáenz MC; Grupo de Trabajo EPINE. Prevalencia de infecciones por *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenemas en España (1999-2005) Enferm Infecc Microbiol Clin 2008; 26: 199-204.

75. Fernández-Cuenca F, Tomás-Carmona M, Caballero-Moyano F, Bou G, Martínez-Martínez L, Vila J, et al. In vitro activity of 18 antimicrobial agents against clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: multicenter national study GEIH-REIPI-Ab 2010. Enfermedades Infecc Microbiol Clin 2013; 31 (1): 4–9.

76. Fernández-Cuenca F, Pascual A, Ribera A, Vila J, Bou G, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pachón J, Martínez-Martínez L; Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria. Clonal diversity and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolated in Spain. A nationwide multicenter study: GEIH-Ab project (2000) Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22 (5): 267-71.

77. Vila J, Marcos F, Marco MA, et al. In vitro antimicrobial production of β -lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 138-41.

78. Seifert H, Baginski R, Schulze A, Pulverer G. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37: 750-3.

79. Shi ZY, Liu PYF, Lau YJ, et al. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Diag Microbiol Infect Dis 1996; 24: 81-5.

80. Friedland I, Stinson L, Ikaidi M, et al. Phenotypic antimicrobial resistance patterns in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*: results of a multicenter intensive care unit surveillance study, 1995–2000. Diag Microbiol Infect Dis 2003; 45: 245-50.

81. Morfin-Otero R, Dowzicky MJ. Changes in MIC within a global collection of *Acinetobacter baumannii* collected as part of the tigecycline evaluation and surveillance trial, 2004 to 2009. Clin Ther 2012; 34 (1): 101-12.

82. Falagas ME, Mourtzoukou EG, Polemis M. Trends in antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from hospitalised patients in Greece and treatment implications. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 816-9.

83. Hoban DJ, Bouchillon SK, Dowzick MJ. Antimicrobial susceptibility of extended-spectrum β -lactamase producers and multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* throughout the United States and comparative in vitro activity of tigecycline, a new

lycylcycline antimicrobial. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57: 423-8.

84. Sader H, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2012). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 78: 443-8.

85. Maragakis LL, Perl TM. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*. 2008; 46: 1254–63.

86. Castanheira M, Jones RN, Livermore DM. Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other non-fermentative bacilli, and *Aeromonas* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 63: 426–33.

87. Marti S, Sánchez-Céspedes J, Alba V, Vila J. In vitro activity of doripenem against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33 (2): 181–2.

88. Cooper TW, Pass SE, Brouse SD, Hall RG. Can pharmacokinetic and pharmacodynamic principles be applied to the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter*? *Ann Pharmacother*. 2011; 45: 229–40.

89. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management. *Curr Opin Infect Dis*. 2010; 23: 332–9.

90. Adnan S, Paterson DL, Lipman J, Roberts JA. Ampicillin/sulbactam: its potential use in treating infections in critically ill patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 42 (5): 384–9.

91. Betrosian AP, Frantzeskaki F, Xanthaki A, *et al*. Efficacy and safety of high-dose ampicillinsulbactam vs. colistin as monotherapy for the treatment of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia. *J Infect*. 2008; 56: 432–6.

92. Chu H, Zhao L, Wang M, Liu Y, Gui T, Zhang J. Sulbactam-based therapy for *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. *Braz J Infect Dis*. 2013; 17: 389–94.

93. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1953–8.

94. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 18–29.

95. Valencia R, Arroyo LA, Conde M, Aldana JM, Torres MJ, Fernández-Cuenca F, *et al*. Nosocomial outbreak of infection with pan-drug-resistant *Acinetobacter*

baumannii in a tertiary care university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2009; 30: 257–63.

96. López-Rojas R, McConnell MJ, Jiménez-Mejías ME, Domínguez-Herrera J, Fernández-Cuenca F, Pachón J. Colistin resistance in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain appearing after colistin treatment: effect on virulence and bacterial fitness. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 4587–9.

97. Yau W, Owen RJ, Poudyal A, *et al.* Colistin-heteroresistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from the Western Pacific region in the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Infect 2009; 58: 138–44.

98. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, *et al.* Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2946–50.

99. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 351–2.

100. Beceiro A, Moreno A, Fernández N, Vallejo JA, Aranda J, Adler B, Harper M, Boyce JD, Bou G. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58 (1): 518–26.

101. Liu Q, Li W, Feng Y, Tao C. Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and metaanalysis. Plos One. 2014; 9:e98091. doi:10.1371/journal.pone.0098091.

102. Mohamed AF, Karaikos I, Plachouras D, Karvanen M, Pontikis K, Jansson B, *et al.* Application of a loading dose of colistin methanesulfonate in critically ill patients: population pharmacokinetics, protein binding, and prediction of bacterial kill. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56: 4241–9.

103. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, *et al.* Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 3430–6.

104. Dalfino L, Puntillo F, Mosca A, Monno R, Spada ML, Coppolecchia S, *et al.* High-dose, extended-interval colistin administration in critically ill patients: is this the right dosing strategy? A preliminary study. Clin Infect Dis 2012; 54 (12): 1720–6.

105. Stain GE, Babinchak T. Tigecycline: an update. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 75: 331–6.

106. Kuo SC, Wang FD, Fung CP, Chen LY, Chen SJ, Chiang MC, *et al.* Clinical experience with tigecycline as treatment for serious infections in elderly and critically ill patients. *J Microbiol Immunol Infect* 2011; 44: 45–51.
107. Lee YT, Tsao SM, Hsueh PR. Clinical outcomes of tigecycline alone or in combination with other antimicrobial agents for the treatment of patients with healthcare-associated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 1211–20.
108. Gilbert DN. Aminoglycosides. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier-Churchill Livingstone; 2005. p. 307–36.
109. Leibovici L, Paul M, Poznanski O, *et al.* Monotherapy versus b-lactam-aminoglycoside combination treatment for gram-negative bacteremia: a prospective, observational study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1127–33.
110. Pachon-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, Jiménez-Mejías ME, Ibáñez-Martínez J, García-Curiel A, Pichardo C, *et al.* Efficacy of rifampin, in monotherapy and in combinations, in an experimental murine pneumonia model caused by panresistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011; 30: 895–901.
111. Pachón-Ibáñez ME, Docobo-Pérez F, López-Rojas R, *et al.* Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1165–72.
112. Vila J, Pachon J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update. *Expert Opin Pharmacother* 2012; 13: 2319–36.
113. Paul M, Lador A, Grozinsky-Glasberg S, *et al.* Betalactam antibiotic monotherapy versus beta lactamaminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;1, CD003344.
114. Hu Y, Li L, Li W, *et al.* Combination antibiotic therapy versus monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a meta-analysis of retrospective and prospective studies. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 42: 492–6.
115. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, *et al.* Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 943–50.
116. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol*. 2004; 327: 539–49.
117. García-Quintanilla M, Pulido MR, McConnell MJ. First steps towards a vaccine

- against *Acinetobacter baumannii*. Curr Pharm Biotechnol 2014; 14: 897– 902.
118. McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev 2013; 37 (2): 130–55.
119. Kwon KT, Oh WS, Song JH, Chang HH, Jung SI, Kim SW, Ryu SY, Heo ST, Jung DS, Rhee JY, Shin SY, Ko KS, Peck KR, Lee NY. Impact of imipenem resistance on mortality in patients with *Acinetobacter bacteraemia*. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 525-30.
120. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 826–36.
121. Bratu S, Landman D, Martin DA, Georgescu C, Quale J. Correlation of antimicrobial resistance with β -Lactamases, the OmpA-Like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52 (9): 2999–3005.
122. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. J Antimicrob Chemother 2010; 65 (10): 2253–4.
123. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 1993; 2 (2): 81–7.
124. Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44 (6): 1556–61.
125. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D (beta)-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49 (1): 202–8.
126. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53 (12): 5035–8.
127. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 440–58.
128. Héritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3198–202.
129. Segal H, Thomas R, Elisha BG. Characterization of class 1 integron resistance

gene cassettes and the identification of a novel IS-like element in *Acinetobacter baumannii*. Plasmid 2003; 49: 169–78.

130. Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. Overexpression of the naturally occurring *bla*OXA-51 gene in *Acinetobacter baumannii* mediated by novel insertion sequence ISAb9. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53, 4045–7.

131. Lopes BS, Al-Hassan L, Amyes GB. ISAb825 controls the expression of the chromosomal *bla*OXA-51-like and the plasmid borne *bla*OXA-58 gene in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from the USA. Clin Microbiol Infect 2012; 18: E446-51.

132. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54: 969–76.

133. Tsakris A, Ikonomidis A, Pournaras S, Tzouvelekis LS, Sofianou D, Legakis NJ, Maniatis AN. VIM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Emerging Infect Dis 2006; 12: 981–3.

134. Roca I, Espinal P, Vila-Farrés X, Vila J. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. Front Microbiol 2012; 3: 148.

135. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 5046–54.

136. Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum β -lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2015 Sep 27]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Structure+of+ADC-68%2C+a+novel+carbapenem-hydrolyzing+class+C+extended-spectrum+%CE%B2-lactamase+isolated+from+Acinetobacter+baumannii>.

137. Villalón P, Valdezate S, Medina-Pascual MJ, Carrasco G, Vindel A, Saez-Nieto JA. Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- β -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. J Antimicrob Chemother 2013; 68 (3): 550–3.

138. Rumbo C, Gato E, López M, Ruiz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Vila J, Pachón J, Cisneros JM, Rodríguez-Baño J, Pascual A, Bou G, Tomás M; Spanish Group of Nosocomial Infections and Mechanisms of Action and Resistance to Antimicrobials (GEIH-GEMARA); Spanish Society of Clinical

Microbiology and Infectious Diseases (SEIMC); Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Contribution of efflux pumps, porins, and β -lactamases to multidrug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (11): 5247–57.

139. Espinal P, Macià MD, Roca I, Gato E, Ruíz E, Fernández-Cuenca F, *et al.* First report of an OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate related to Tn2006 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (1): 589–91.

140. Merino M, Poza M, Roca I, Barba MJ, Sousa MD, Vila J, *et al.* Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23 carbapenemase in Spain. *Microb Drug Resist* 2014; 20 (4): 259–63.

141. Mosqueda N, Espinal P, Cosgaya C, Viota S, Plasencia V, Alvarez-Lerma F, Montero M, Gómez J, Horcajada JP, Vila J, Roca I. Globally expanding carbapenemase finally appears in Spain: nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing plasmid-encoded OXA-23 in Barcelona, Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (10): 5155–7.

142. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1210–15.

143. Mussi MA, Relling VM, Limansky AS, Viale AM. CarO, an *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake. *FEBS Lett* 2007; 581 (29): 5573–8.

144. Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, Mugnier P, Nordmann P, Siroy A, Jouenne T, Dé E. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 (9): 2053–6.

145. Gehrlein M, Lying H, Cullmann W, Wendt S, Opferkuch W. Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* 1991; 37: 405–12.

146. Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51 (3): 565–74.

147. Wong EW, Yusof MY, Mansor MB, Anbazhagan D, Ong SY, Sekaran SD. Disruption of *adeB* gene has a greater effect on resistance to meropenem than *adeB* gene in *Acinetobacter* spp. isolated from University Malaya Medical Centre. *Singapore Med J* 2009; 50: 822–6.

148. Roca I, Marti S, Espinal P, Martinez P, Gilbert I, Vila J. CraA, a major facilitator superfamily efflux pump associated with chloramphenicol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 53: 4013-4.
149. Jones CL, Clancy M, Honnold C, Singh S, Snesrud E, Onmus-Leone F, *et al*. Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. *Clin Infect Dis* 2015; 61 (2): 145–54.
150. Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life* 2011; 63: 1055–60.
151. Lee JC, Koerten H, van den Broek P, Beekhuizen H, Wolterbeek R, van den Barselaar M, van der Reijden T, van der Meer J, van de Gevel J, Dijkshoorn L. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Res Microbiol* 2006; 157, 360–6.
152. de Breij A, Dijkshoorn L, Lagendijk E, van der Meer J, Koster A, Bloemberg G, Wolterbeek R, van den Broek P, Nibbering P. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *Plos One* 2010; 5 (5): e10732.
153. Costerton J. Overview of microbial biofilm. *J Ind Microbiol*. 1995; 15: 137–40.
154. McQueary CN, Actis LA. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol* 2011; 49: 243–50.
155. Posta JC, *et al*. The role of biofilms in otolaryngologic infections: update 2007. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 15: 347–51.
156. De Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, *et al*. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. *Res Microbiol* 2009; 160 (3): 213–8.
157. Espinal P, Martí S, Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on drysurfaces. *J Hosp Infect* 2012; 80: 56–60.
158. Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 49-54.
159. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperoneusher pili assembly system. *Microbiology* 2003; 149: 3473–84.
160. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm

formation and cellular morphology. *Microbiology* 2008; 154: 3398–409.

161. Liou ML, Soo PC, Ling SR, Kuo HY, Tang CY, Chang KC. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Immunol Infect* 2013; S1684-1182(12)00246-0.

162. Loehfelm TW, Luke NR, Campagnari AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol* 2008; 190: 1036–44.

163. Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* 2012; 80, 228-33.

164. Goh HM, Beatson SA, Totsika M, Moriel DG, Phan MD, Szubert J, Runnegar N, Sidjabat HE, Paterson DL, Nimmo GR, Lipman J, Schembri MA. Molecular analysis of the *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79, 6535-43.

165. Iwashkiw JA, Seper A, Weber BS, Scott NE, Vinogradov E, Stratilo C, Reiz B, Cordwell SJ, Whittall R, Schild S, Feldman MF. Identification of a general O-linked protein glycosylation system in *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and biofilm formation. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002758.

166. Choi AH, Slamti L, Avci FY, Pier GB, Maira-Litrán T. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta- 1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. *J Bacteriol* 2009; 191, 5953-63.

167. Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* 2009; 77: 3150– 60.

168. McBride MJ. Shining a light on an opportunistic pathogen. *J Bacteriol.* 2010; 192, 6325–6.

169. Antunes LC, Imperi F, Towner KJ, Visca P. Genome assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Res Microbiol* 2011; 162: 279–84.

170. Henrichsen J, Blom J. Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *ActaPathol Microbiol Scand B* 1975; 83, 103–15.

171. Eijkelkamp BA, Stroeher UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii*

isolates. FEMS Microbiol Lett 2011; 323, 44-51.

172. Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. Microbiol Read Engl 2011; 157 (9): 2534–44.

173. Merz AJ, So M, Sheetz MP. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. Nature 2000; 407: 98–102.

174. Wilharm G, Piesker J, Laue M, Skiebe E. DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. J Bacteriol 2013; 195 (18): 4146-53.

175. Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annu Rev Microbiol 2004; 58: 611–47.

176. Dorsey CW, Tomaras AP, Connerly PL, Tolmasky ME, Crosa JH, Actis LA. The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. Microbiology 2004; 150: 3657–67.

177. Yamamoto S, Okujo N, Sakakibara Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. Arch Microbiol 1994; 162: 249–52.

178. Mihara K, Tanabe T, Yamakawa Y, Funahashi T, Nakao H, Narimatsu S, Yamamoto S. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. Microbiology 2004; 150: 2587–97.

179. Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. BMC Genomics 2011; 12: 126.

180. Zimble DL, Penwell WF, Gaddy JA, Menke SM, Tomaras AP, Connerly PL, Actis LA. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. Biometals 2009; 22: 23–32.

181. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars and mice. Infect Immun 2012; 80: 1015–24.

182. Modarresi F, Azizi O, Shakibaie MR, Motamedifar M, Mosadegh E, Mansouri S. Iron limitation enhances acyl homoserine lactone (AHL) production and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Virulence 2015; 6 (2): 152-61.

183. Bouvet P, Grimont P. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition

of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int J Syst Evol Microbiol 1986; 36: 228–40.

184. Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. PLoS ONE 2011; 6: e22674.

185. Choi CH, Lee EY, Lee YC *et al.* Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol 2005; 7: 1127–38.

186. Choi CH, Lee JS, Lee YC, Park TI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. BMC Microbiol 2008; 8: 216.

187. Kim SW, Choi CH, Moon DC, Jin JS, Lee JH, Shin JH, Kim JM, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. FEMS Microbiol Lett 2009; 301: 224–31.

188. Avril JL, Mesnard R. Factors influencing the virulence of *Acinetobacter*. En Towner KJ, Bergogne-Bérézin, Fewson CA editores. The biology of *Acinetobacter*. New York: Plenum Publishing Corp.; 1991, p 77-82.

189. Joly-Guillou ML. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 868-73.

190. Kaplan N, Rosenberg E, Jann B; Jann K. Structural studies of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4. Eur J Biochem 1985; 152: 453-8.

191. Rosenberg E, Kaplan N, Pines M, Rosenberg M, Gutnick D. Capsular polysaccharides interfere with adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* to hydrocarbon. FEMS Microbiol Lett 1983; 17: 157-60.

192. Simoes LC, Simoes M, Vieira MJ. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. Appl Environ Microbiol 2007; 73: 6192- 200.

193. McConnell MJ, Domínguez-Herrera J, Smani Y, López-Rojas R, Docobo-Pérez F, Pachón J. Vaccination with outer membrane complexes elicits rapid protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Infect Immun 2011; 79: 518–26.

194. Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98 (25): 14607e12.

195. Bjorkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI. Effects of

environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science* 2000; 287 (5457): 1479e82.

196. Fernández-Cuenca F, Smani Y, Gómez-Sánchez MC, Docobo- Pérez F, Caballero-Moyano FJ, Domínguez-Herrera J, Pascual A, Pachón J. Attenuated virulence of a slow-growing pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* is associated with decreased expression of genes encoding the porins CarO and OprD-like. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38, 548–9.

197. Moya B, Juan C, Albertí S, Pérez JL, Oliver A. Benefit of having multiple ampD genes for acquiring beta-lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52 (10): 3694-700.

198. López-Rojas R, Domínguez-Herrera J, McConnell MJ, Docobo-Pérez F, Smani Y, Fernández-Reyes M, Rivas L, Pachón J. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis* 2011; 203: 545–8.

199. Fernández-Reyes M, Rodríguez-Falcón M, Chiva C, Pachón J, Andreu D, Rivas L. The cost of resistance to colistin in *A. baumannii*: a proteomic perspective. *Proteomics* 2009; 9: 1632-45.

200. He X, Lu F, Yuan F, Jiang D, Zhao P, Zhu J, Cheng H, Cao J, Lu G. Biofilm formation caused by clinical *Acinetobacter baumannii* isolates is associated with overexpression of the AdeFGH efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59 (8): 4817-25.

201. Gurung J, Khyriem AB, Banik A, Lyngdoh WV, Choudhury B, Bhattacharyya P. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. *Indian J Crit Care Med* 2013; 17 (4): 214-8.

202. Badave GK, Dhananjay K. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging challenge. *J Clin Diagn Res* 2015; 9 (1): BD08-10.

203. Rao RS, Karthika RU, Singh SP, Shashikala P, Kanungo R, Jayachandran S, *et al*. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26 (4): 333–7.

204. Wroblewska MM, Sawicka-Grzelak A, Marchel H, Luczak M, Sivan A. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 53 (1): 140-4.

205. Rodríguez-Baño J, Martí S, Soto S, Fernández-Cuenca F, Cisneros JM, Pachón

- J, Pascual A, Martínez-Martínez L, McQueary C, Actis LA, Vila J; Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH). Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. Clin Microbiol Infect. 2008; 14 (3): 276-8.
206. Sugarawa E, Nikaido H. OmpA Is the Principal Nonspecific Slow Porin of *Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol 2012; 194 (15): 4089-96.
207. Smani Y, Fàbrega A, Roca I, Sánchez-Encinales V, Vila J, Pachón J. Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2014; 58 (3): 1806–8.
208. Fukuoka T, Ohya S, Narita T, Katsuta M, Iijima M, Masuda N, *et al.* Activity of the carbapenem panipenem and role of the OprD (D2) protein in its diffusion through the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37 (2): 322–7.
209. Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. J Clin Microbiol 2002; 40: 4776–8.
210. Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens JP, Lew PD, Suter PM. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic “blind” bronchoalveolar lavage fluid. Am Rev Respir Dis. 1991; 143 (5 Pt 1): 1121–9.
211. Garnacho J, Sole-Violan J, Sa-Borges M, Diaz E, Rello J. Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: a matched cohort study. Crit Care Med 2003; 31(10): 2478–82.
212. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. Crit Care Med 1985; 13(10): 818–29.
213. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. J Chronic Dis 1987; 40 (5): 373–83.
214. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 1992; 101 (6): 1644–55.
215. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, *et al.* Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney

injury. Crit Care Lond Engl 2007; 11 (2): R31.

216. Martín-Lozano D, Cisneros JM, Becerril B, Cuberos L, Prados T, Ortiz-Leyba C, et al. Comparison of a repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR method and clinical and microbiological methods for determining strain sources in cases of nosocomial *Acinetobacter baumannii* bacteremia. J Clin Microbiol 2002; 40 (12): 4571–5.

217. Gautam RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. J Clin Microbiol 1997; 35 (11): 2977–80.

218. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33 (9): 2233–9.

219. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI document M100-S17. CLSI, Wayne, PA.

220. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Steering Committee 2006. EUCAST technical note on tigecycline. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 1147–9.

221. Soussy CJ. Les Recommandations du Comité de l'Antibiogramme (CA-SFM) En: http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM_2012.pdf. Último acceso: 6/7/2015.

222. Clinical and Laboratory Standards Institute. 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. CLSI document M26-A. CLSI, Wayne, Pa.

223. Lee K, Yong D, Yum, et al. Evaluation of Etest MBL for detection of *bla*IMP-1 and *bla*VIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2005; 43 (2): 942-4.

224. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. Int J Antimicrob Agents 2006; 27 (4): 351–3.

225. Ruiz M, Marti S, Fernandez-Cuenca F, Pascual A, Vila J. High prevalence of carbapenem-hydrolysing oxacillinases in epidemiologically related and unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Spain. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (12): 1192–8.

226. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid

detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2007; 59 (2): 321-2.

227. Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Conejo MC, Ayala JA, Perea EJ, Pascual A. Relationship between beta-lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2003; 51 (3): 565–74.

228. Frutos F, Alía I, Lorenzo MR, García-Pardo J, Nolla M, Ibáñez J, Tirapu JP, Macías S, Blanco J, Benito S, Anzueto A, Esteban A, Grupo Español del International Mechanical Ventilation Group Study. Utilización de la ventilación mecánica en 72 unidades de cuidados intensivos en España. Med Intensiva 2003; 27 (1): 1-12.

229. Arvaniti K, Lathyris D, Ruimy R, *et al.* The importance of colonization pressure in multiresistant *Acinetobacter baumannii* acquisition in a Greek intensive care unit. Crit Care 2012; 16 (3): R102.

230. Playford EG, Cragi JC, Iredell JR. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. J Hosp Infect 2007; 65: 204-11.

231. Di Bonito M, Caiazzo S, Iannazzone M, Micciché V, De Marco G, De Robertis E, *et al.* Prognostic differences between VAP from *Acinetobacter baumannii* and VAP from other microorganisms. Transl Med UniSa 2012; 3: 15–21.

232. Tejada Artigas A, Bello Dronda S, Chacón Vallés E, Muñoz Marco J, Villuendas Usón MC, Figueras P, *et al.* Risk factors for nosocomial pneumonia in critically ill trauma patients. Crit Care Med 2001; 29 (2): 304–9.

233. Álvarez Lerma F, Sánchez García M, Lorente L, Gordo F, Añón JM, Álvarez J, Palomar M, García R, Arias S, Vázquez-Calatayud M, Jam R; Sociedad Española de Medicina Intensiva; Sociedad Española de Enfermería Intensiva. Guidelines for the prevention of ventilator-associated pneumonia and their implementation. The Spanish “Zero-VAP” bundle. Med Intensiva 2014; 38 (4): 226-36.

234. Estudio Nacional de Vigilancia de Infección Nosocomial en UCI (ENVIN-UCI) 2001---2009; 2012. Available from: URL: <http://hws.vhebron.net/envin-helics/>.

235. Edwards JR, Peterson KD, Mu Y, Banerjee S, Allen-Bridson K, Morrell G, *et al.* National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. Am J Infect Control 2009; 37: 783-805.

236. Saravu K, Preethi V, Kumar R, Guddattu V, Shastry AB, Mukhopadhyay C. Determinants of ventilator associated pneumonia and its impact on prognosis: A tertiary care experience. Indian J Crit Care Med 2013; 17 (6): 337–42.

237. Husni RN, Goldstein LS, Arroliga AC, Hall GS, Fatica C, Stoller JK, *et al.* Risk factors for an outbreak of multi-drug-resistant *Acinetobacter nosocomial* pneumonia among intubated patients. *Chest* 1999; 115 (5): 1378–82.
238. Latibeaudiere R, Rosa R, Laowansiri P, Arheart K, Namias N, Munoz-Price LS. Surveillance cultures growing carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* predict the development of clinical infections: a retrospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2015; 60 (3): 415–22.
239. Chusri S, Silipapojakul K, McNeil E, Singkhamanan K, Chongsuvivatwong V. Impact of antibiotic exposure on occurrence of nosocomial carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection: a case control study. *J Infect Chemother* 2015; 21 (2): 90-5.
240. Tan MW, Lye DC, Ng TM, Nikolau M, Tam VH. Mathematical model to quantify the effects of risk factors on carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58 (9): 5239-44.
241. Nucleo E, Steffanoni L, Fugazza G, Migliavacca R, Giacobone E, Navarra A, Pagani L, Landini P. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol* 2009; 9: 270.
242. Berton DC, Kalil AC, Cavalcanti M, Teixeira PJZ. Quantitative versus qualitative cultures of respiratory secretions for clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2008 [cited 2015 Dec 5]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD006482.pub2/abstract>
243. Estella A, Álvarez-Lerma F. ¿Debemos mejorar el diagnóstico de la neumonía asociada a ventilación mecánica? *Med Intensiva* 2011; 35 (9): 578-9.
244. Fujitani S, Yu VL. Quantitative cultures for diagnosing ventilator-associated pneumonia: a critique. *Clin Infect Dis* 2006; 43: S106-13.
245. Cook D, Mandell L. Endotracheal aspiration in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2000; 117: 195S–7S.
246. Berdal JE, Bjornholt J, Blomfeldt A, Smith-Erichsen N, Bukholm. Patterns and dynamics of airway colonisation in mechanically-ventilated patients. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 476-80.
247. Feldman C, Kassel M, Cantrell J, Kaka S, Morar R, Goolam Mahomed A, *et al.* The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *Eur Respir J* 1999; 13 (3): 546–51.

248. Caricato A, Montini L, Bello G, Michetti V, Maviglia R, Bocci MG, et al. Risk factors and outcome of *Acinetobacter baumannii* infection in severe trauma patients. *Intensive Care Med* 2009; 35 (11): 1964–9.
249. Mao Y, Liu G, Wang L, Wang X, Li F. The impact of pulmonary *Acinetobacter baumannii* infection on the prognosis of inpatients in a neurological intensive care unit. *J Int Med Res* 2013; 41: 1120-6.
250. Chaari A, Mnif B, Bahloul M, Mahjoubi F, Chatara K, Turki O, Gharbi N, Chelly H, Hammani A, Bouaziz M. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiology, clinical characteristics and risk factors. *Int J Infect Dis* 2013; 17 (12): e1225-8.
251. Kollef MH, Silver P, Murphy DM, et al. The effect of late-onset ventilator associated pneumonia in determining patient mortality. *Chest* 1995; 108: 1655-62.
252. Zhuo H, Yang K, Lynch SV, Dotson RH, Glidden DV, Singh G, Webb WR, Elicker BM, Garcia O, Brown R, Sawa Y, Misset B, Wiener-Kronish JP. Increased mortality of ventilated patients with endotracheal *Pseudomonas aeruginosa* without clinical signs of infection. *Crit Care Med* 2008; 36: 2495-503.
253. Magret M, Amaya-Villar R, Garnacho J, Lisboa T, Díaz E, Dewaele J, et al. Ventilator-associated pneumonia in trauma patients is associated with lower mortality: results from EU-VAP study. *J Trauma* 2010; 69 (4): 849–54.
254. Joung MK, Kwon KT, Kang CI, Cheong HS, Rhee JY, Jung DS, Chung SM, Lee JA, Moon SY, Ko KS, Chung DR, Lee NY, Song JH, Peck KR. Impact of inappropriate antimicrobial therapy on outcome in patients with hospital-acquired pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii*. *J Infect* 2010; 61: 212-18.
255. Agrafiotis M, Siempos II, Ntaidou TK, Falagas ME. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 1154-63.
256. Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, Paterson DL, Shoham S, Jacob J, et al. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 (7): 3284–94.
257. Park JH, Choi SH, Chung JW. The impact of early adequate antimicrobial therapy on 14-day mortality in patients with monomicrobial *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Chemother* 2013; 19 (5): 843-9.
258. Karnik ND, Sridharan K, Jadhav SP, Kadam PP, Naidu RK, Namjoshi RD, Gupta V, Gore MS, Surase PV, Mehta PR, Gogtay JA, Thatte UM, Gogtay NJ.

Pharmacokinetics of colistin in critically ill patients with multidrug-resistant Gram-negative bacilli infection. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69 (7): 1429-36.

259. Kallel H, Hergafi L, Bahloul M, Hakim A, Dammak H, Chelly H, Hamida CB, Chaari A, Rekik N, Bouaziz M. Safety and efficacy of colistin compared with imipenem in the treatment of ventilator-associated pneumonia: a matched case-control study. *Intensive Care Med* 2007; 33 (7): 1162-7.

260. Markou N, Markantonis SL, Dimitrakis E, Panidis D, Boutzouka E, Karatzas S, Rafailidis P, Apostolakos H, Baltopoulos G. Colistin serum concentrations after intravenous administration in critically ill patients with serious multidrug-resistant, gram-negative bacilli infections: a prospective, open-label, uncontrolled study. *Clin Ther* 2008; 30 (1): 143-51.

261. Magret M, Lisboa T, Martin-Loeches I, Máñez R, Nauwynck M, Wrigge H, Cardellino S, Díaz E, Koulenti D, Rello J; EU-VAP/CAP Study Group. Bacteremia is an independent risk factor for mortality in nosocomial pneumonia: a prospective and observational multicenter study. *Crit Care* 2011; 15: R62.

262. Liu CP, Shih SC, Wang NY, Wu AY, Sun FJ, Chow SF, Chen TL, Yan TR. Risk factors of mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect*. DOI: 10.1016/j.jmii.2014.10.006.

263. Park KH, Shin JH, Lee SY, Kim SH, Jang MO, Kang SJ, Jung SI, Chung EK, Ko KS, Jang HC. The clinical characteristics, carbapenem-resistance and outcome of *Acinetobacter* bacteremia according to genospecies. *Plos One* 2013; 8 (6): e65026.

264. Metan G, Sariguzel F, Sumerkan B. Factors influencing survival in patients with multi-drug-resistant *Acinetobacter* bacteraemia. *Eur J Intern Med*. 2009; 20 (5): 540-4.

265. Zhang XC, Zhang ZD, Huang DS. Prediction of length of ICU-stay using data-mining techniques: an example of old critically ill postoperative gastric cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13 (1): 97-101.

266. Azarfarin R, Ashouri N, Totonchi Z, Bakhshandeh H, Yoghoubi A. Factors influencing prolonged ICU stay after open heart surgery. *Res Cardiovasc Med* 2014; 3 (4): e20159.

267. Eberle BM, Schnüriger B, Putty B, Barmparas G, Kobayashi L, Inaba K, Belzberg H, Demetriades D. The impact of *Acinetobacter baumannii* infections on outcome in trauma patients: a matched cohort study. *Crit Care med* 2010; 38 (11): 2133-8.

268. Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SG. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by

- use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of bla(OXA-51-like) genes. J Clin Microbiol 2010; 48 (7): 2476-83.
269. Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Gaultier MP, Mallat H, Moghnieh 5, Husni-Samaha R, Joly-Guillou ML, Kempf M. Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Lebanon using four different typing methods. Plos One 2014; 9 (12): e115969.
270. Fernández-Cuenca F, López-Cerero L, Pascual-Hernández A. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. Enferm Infecc Microbiol Clin 2013; 31 (S1): 20-5.
271. Reboli AC, Houston ED, Monteforte JS, Wood CA, Hamill RJ. Discrimination of epidemic and sporadic isolates of *Acinetobacter baumannii* by repetitive element PCR-mediated DNA fingerprinting. J Clin Microbiol 1994; 32: 2635-40.
272. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 1984; 37 (1): 67–75.
273. Villar M, Cano ME, Gato E, Garnacho-Montero J, Miguel Cisneros J, Ruíz de Alegría C, Fernández-Cuenca F, Martínez-Martínez L, Vila J, Pascual A, Tomás M, Bou G, Rodríguez-Baño J; GEIH/GEMARA/REIPI-Ab20101 Group. Epidemiologic and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: a reappraisal. Medicine 2014; 93 (5): 202-10.
274. Kandi V. Biofilm production correlating with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J Clin Diagn Res 2015; 9 (6): DJ02.
275. Na IY, Chung ES, Jung CY, Kim DH, Shin J, Kang K, Kim ST, Ko KS. Comparison of the virulence-associated phenotypes of five species of *Acinetobacter baumannii* complex. J Microbiol Biotechnol 2015. [Epub ahead of print].
276. Eraç B, Yilmaz FF, Hosgör-Limoncu M, Oztürk I, Aydemir S. Investigation of the virulence factors of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Mikrobiyol Bul 2014; 48 (1): 70-81.
277. Tayabali AF, Nguyen KC, Schwed PS, Cristhwait J, Coleman G, Seligy VL. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. PLoS One 2012; 7 (5): e37024.
278. Walzer G, Rosenberg E, Ron EZ. The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. Environ Microbiol 2006; 8: 1026-32.
279. Chen BM, Yu JL, Liu GX, Hu LY, Li LQ, Li F, Yang H. Electron microscopic analysis of biofilm on tracheal tubes removed from intubated neonates and the relationship between biofilm and lower respiratory infection]. Zhonghua Er Ke Za Zhi.

2007; 45 (9): 655-60.

280. Gil-Perontin S, Ramírez P, Martí V, Sahuquillo JM, González E, Calleja I, Menéndez R, Bonastre J. Implications of endotracheal tube biofilm in ventilator-associated pneumonia response: a state of concept. Crit Care 2012

281. Raad II, Mohamed JA; Reitzel RA, Jiang Y, Dvorak TL, Ghannoum MA, Hachem RY, Chaftari AM. The prevention of biofilm colonization by multidrug-resistant pathogens that cause ventilator-associated pneumonia with antimicrobial-coated endotracheal tubes. Biomaterials 2011; 32 (11): 2689-94.

282. Kempf M, Eveillard M, Deshayes C, Ghamrawi S, Lefrançois C, Georgeault S, Bastiat G, Seifert H, Joly-Guillou ML. Cell surface properties of two differently virulent strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient. Can J Microbiol 2012; 58 (3): 311-7.

283. Zhang D, Xia J, Xu Y, Gong M, Zhou Y, Xie L, Fang X. Biological features of biofilm-forming ability of *Acinetobacter baumannii* strains derived from 121 elderly patients with hospital-acquired pneumonia. Clin Exp Med 2014 [Epub ahead print].

284. Méndez JA, Mateos J, Beceiro A, López M, Tomás M, Poza M, Bou G. Quantitative proteomic analysis of host-pathogen interactions: a study of *Acinetobacter baumannii* responses to host airways. BMC Genomics 2015; 16: 422.

285. Smani Y, López-Rojas R, Roca I, Fábrega A, Vila J, Pachón. Loss of outer membrane protein A (OmpA) affects the fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. [abstract B1329]. In: Program and abstracts of the 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Francisco). Washington, DC: American Society for Microbiology, 2012:143.

286. Schweppe DK, Harding C, Chavez JD, et al. Host-Microbe Protein Interactions during Bacterial Infection. Chem Biol 2015; 22: 1521-30.

287. March C, Moranta D, Regueiro V, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. J Biol Chem 2011; 286: 9956-67.

288. Wang N, Ozer EA, Mandel MJ, Hauser AR. Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. MBio 2014; 5: e01163–01114.

289. Tseng YT, Wang SW, Kim KS, et al. Nlpl facilitates deposition of C4bp on *Escherichia coli* by blocking classical complement-mediated killing, which results in high-level bacteremia. Infect Immun 2012; 80: 3669-78.

290. Prasadarao NV, Wass CA, Stins MF, Kim KS. Outer membrane protein A-

promoted actin condensation of brain microvascular endothelial cells is required for *Escherichia coli* invasion Infect Immun 1999; 67: 5775-83.

291. Fito-Boncompite L, Chapalain A, Bouffartigues E, *et al.* Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. Infect Immun 2011; 79 (3): 1176-86.

292. Lundrigan MD, Webb RM. Prevalence of ompT among *Escherichia coli* isolates of human origin. FEMS Microbiol Lett 1992; 76: 51-6.

293. Sannes MR, Kuskowski MA, Owens K, Gajewski A, Johnson JR. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. J Infect Dis 2004; 190: 2121-8.

294. Cope LD, Pelzel SE, Latimer JL, Hansen EJ. Characterization of a mutant of *Haemophilus influenzae* type b lacking the P2 major outer membrane protein. Infect Immun 1990; 58: 3312-8.

295. Lin HH, Hsu CC, Yang CD, Ju YW, Chen YP, Tseng CP. Negative effect of glucose on ompA mRNA stability: a potential role of cyclic AMP in the repression of hfq in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2011; 193 (20): 5833-40.

296. Wand ME, Bock LJ, Turton JF, Nugent PG, Sutton JM. *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. J Med Microbiol 2012; 61 (4): 470-7.

297. Mittal R, Wang Y, Hunter CJ, Gonzalez-Gomez I, Prasadarao NV. Brain damage in newborn rat model of meningitis by *Enterobacter sakazakii*: a role for outer membrane protein A. Lab Invest 2009; 89: 263-77.

298. Mittal R, Krishnan S, Gonzalez-Gomez I, Prasadarao NV. Deciphering the roles of outer membrane protein A extracellular loops in the pathogenesis of *Escherichia coli* K1 meningitis. J Biol Chem 2011; 286: 2183-93.

299. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 268–81.

300. Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 65 (4): 414–26.

301. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). J Antimicrob Chemother 2011; 66 (9): 2070–4.

302. Tsiatsiou O, Iosifidis E, Katragkou A, Dimou V, Sarafidis K, Karampatakis T, et al. Successful management of an outbreak due to carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr* 2015; 174 (1): 65–74.
303. Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, Quattrocchi A, Bellocchi P, Poulou A, et al. Spread of a carbapenem- and colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clonal strain causing outbreaks in two Sicilian hospitals. *J Hosp Infect* 2014; 86 (4): 260–6.
304. Labarca JA, Salles MJC, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Crit Rev Microbiol* 2014; 1–17.
305. Kempf M, Rolain J-M, Azza S, Diene S, Joly-Guillou M-L, Dubourg G, et al. Investigation of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems in Marseille hospitals, south of France: a transition from an epidemic to an endemic situation. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2013; 121 (1): 64–71.
306. Wang SH, Sheng WH, Chang YY, Wang LH, Lin HC, Chen ML, et al. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. *J Hosp Infect* 2003; 53 (2): 97–102.
307. Guerrero-Lozano I, Fernández-Cuenca F, Galán-Sánchez F, Egea P, Rodríguez-Iglesias M, Pascual A. Description of the OXA-23 β -lactamase gene located within Tn2007 in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *Microb Drug Resist* 2015; 21 (2): 215-7.
308. Principe L, Piazza A, Giani T, Bracco S, Caltagirone MS, Arena F, Nucleo E, Tammaro F, Rossolini GM, Pagani L, Luzzaro F, AMCLI-CRAB Survey Participants. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: results of the first cross-sectional countrywide survey. *J Clin Microbiol* 2014; 52 (8): 3004-10.
309. Azizi O, Shakibaie MR, Modarresi F, Shahcheraghi F. Molecular detection of class-D OXA carbapenemase genes in biofilm and non-biofilm forming clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8 (1): e21042.
310. Ma Z, Zhou L, Wang H, Luo L. Investigation on the genomic diversity of OXA from isolated *Acinetobacter baumannii*. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8 (3): 4429-32.
311. Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (4): 1442-8.
312. Ravasi P, Limansky AS, Rodriguez RE, Viale AM, Mussi MA. ISAb825, a functional insertion sequence modulating genomic plasticity and blaOXA-58 expression

- in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 917–20.
313. Bahador A, Raoofian R, Pourakbari B, Taheri M, Hashemizadeh Z, Hashemi FB. Genotypic and antimicrobial susceptibility of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: analysis of its *Aba* elements and *bla*OXA-23-like genes including a new variant. Front Microbiol 2015; 13 (6): 1249.
314. Merino M, Acosta J, Poza M, Sanz F, Beceiro A, Chaves F, Bou G. OXA-24 carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54 (6): 2724-7.
315. Mussi MA, Limansky AS, Viale AM. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 1432–40.
316. Lu PL, Doumith M, Livermore DM, Chen TP, Woodford N. Diversity of carbapenem resistance mechanisms in *Acinetobacter baumannii* from a Taiwan hospital: spread of plasmid-borne OXA-72 carbapenemase. J Antimicrob Chemother 2009; 63 (4): 641-7.
317. Lee Y, Kim CL, Lee H, Jeong SH, Yong D, Lee K. A novel insertion sequence, ISAba10, inserted into ISAba1 adjacents to the *bla*OXA-23 gene and disrupting the outermembrane protein gene *carO* in *Acinetobacter baumannii*. Antmicrob Agent Chemother 2011; 55 (1): 361-3.
318. Sen B, Joshi SG. Studies on *Acinetobacter baumannii* involving multiple mechanisms of carbapenem resistance. J Appl Microbiol 2015. [Epub ahead of print].
319. Fernando D, Zhanel G, Kumar A. Antibiotic resistance and expression of resistance-nodulation-division pump- and outer membrane porin-encoding genes in *Acinetobacter* species isolated from Canadian hospitals. Can j Infect Dis Med Microbiol 2013; 24(1): 17-21.
320. Fonseca EL, Scheidegger E, Freitas FS, Cipriano R, Vicente AC. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of *carO* alleles expression and *bla*OXA-23 gene. BMC Microbiol 2013; 13: 245.
321. Bazyleu A, Kumar A. Incubation temperature, osmolarity, and salicylate affect the expression of resistance-nodulation-division efflux pumps and outer membrane porins in *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T. FEMS Microbiol Lett 2014; 357 (2): 136-43.
322. Jones CL, Clancy M, Honnold C, Singh S, Snestrud E, Ommus-Leone F,

McGann P, Ong AC, Kwak Y, Waterman P, Zurawski DV, Clifford RJ, Lesho E. Fatal outbreak of an emerging clone of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* with enhanced virulence. Clin Infect Dis 2015; 61 (2): 145-54.

323. Paterson DL, Harris PNA. The new *Acinetobacter* equation: hypervirulence plus antibiotic resistance equals big trouble. Clin Infect Dis 2015; 61 (2): 155-6.

324. Dhabaan GN, AbuBakar S, Cerqueira GM, Al-Haroni M, Sui Ping P, Hassan H. Imipenem treatment induces the expression of important genes and phenotypes in a resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. Antimicrob Agents Chemother 2015; [Epub ahead of print].